

# **Synthetische Glycopolypeptide und Ihre Interaktionen mit Lektinen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Katharina Haak  
aus Celle

1. Referent: Prof. Dr. Henning Menzel
2. Referent: apl. Prof. Dr. Hans-Joachim Jördening

eingereicht am: 26.07.2017

mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.10.2017

Druckjahr 2017

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge**

Haak, K.; Mildner, R.; Menzel, H.: Synthetic, pH-responsive Glycopolypeptides and their Interactions with Lectins (Poster), 4<sup>th</sup> Annual Retreat - HZI Graduate School, Goslar-Hahnenklee, **2013**

Haak, K.; Mildner, R.; Menzel, H.: Synthetic, pH-responsive Glycopolypeptides and their Interactions with Lectins (Poster), Advanced Materials for Biomedical Applications (AMBA), Ghent (Belgien), **2014**

Haak, K.; Mildner, R.; Menzel, H.: Investigation of Glycopolypeptide-Lectin Interactions using QCM-D (Poster), 5<sup>th</sup> Annual Retreat - HZI Graduate School, Goslar-Hahnenklee, **2014**

Haak, K.; Mildner, R.; Menzel, H.: Synthetic, pH-responsive Glycopolypeptides and their Interactions with Lectins (Poster), 6. Braunschweiger Jungchemiker Tagung, Braunschweig, **2015**

Haak, K.; Tolle, C.; Riedel, J.: Polymers and Biology – A promising alliance (Vortrag), 6<sup>th</sup> Annual Retreat - HZI Graduate School, Braunschweig, **2015**

Haak, K.; Mildner, R.; Menzel, H.: Synthetic, pH-responsive Glycopolypeptides and their Interactions with Lectins (Poster), European Polymer Federation Congress (EPF), Dresden, **2015**

Haak, K.; Mildner, R.; Menzel, H.: Synthetic, pH-responsive Glycopolypeptides and their Interactions with Lectins (Poster), 27<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials (ESB), Kraków (Polen), **2015**

Haak, K.; Mildner, R.; Menzel, H.: Synthetic, pH-responsive Glycopolypeptides and their Interactions with Lectins (Poster), 10<sup>th</sup> World Biomaterials Congress (WBC), Montréal (Kanada), **2016**

Menzel, H.; Haak, K.; Mildner, R.: pH-responsive, synthetic glycopolypeptides and their interactions with lectins (Vortrag), 12<sup>th</sup> International Conference on “Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, Ghent (Belgien), **2017**

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre fachliche oder persönliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Mentor Prof. Dr. Henning Menzel danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Betreuung meines Forschungsthemas, sowie für die stete Diskussionsbereitschaft während der Promotion. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Herrn apl. Prof. Dr. Hans-Joachim Jördening für die Übernahme des Korreferats, sowie Herrn Dr. Christof Maul für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Dem Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig danke ich für die langjährige Möglichkeit zur dauerhaften Nutzung des CD-Spektropolarimeters. Der Abteilung Strukturbiologie des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung, insbesondere Dr. Andrea Scrima, danke ich für die Möglichkeit der ITC Messungen und die freundliche Einweisung und Unterstützung.

Bei Dr. Robert Mildner möchte ich mich für die gute Einführung ins Thema und die konstruktiven Diskussionen bedanken. Dr. Wibke Dempwolf und Gabi Schirmer danke ich für die schnelle und unkomplizierte Unterstützung bei Problemen aller Art. Ohne euch, würde unser Arbeitsalltag oft nicht so reibungslos laufen. Ein großes Dankeschön geht auch an unsere beiden Laborantinnen Maren und Laura, die mich tatkräftig im Labor unterstützt haben. Vor allem Maren möchte ich für die vielen Stunden am UV/Vis und für die Unterstützung bei den Messungen an der GPC danken. Meinen Forschungspraktikanten Alex, Melanie, Henrik und Lena danke ich für die praktische Mitarbeit im Labor. Dr. Nils Poth danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe Menzel für die gute Arbeitsatmosphäre und die vielen Späße, die den Unialltag aufgelockert haben!

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die mir während des Studiums und der Promotion stets Rückhalt und Unterstützung gegeben haben. Danke für alles, was ihr für mich getan habt!

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zielsetzung.....	2
2	Glycoproteine und synthetische Analoga .....	3
2.1	Glycoproteine .....	3
2.2	Synthetische Glycoprotein Mimetika .....	7
2.3	Synthetische Glycopolypeptide .....	8
2.3.1	Amin-initiierte ringöffnende Polymerisation von NCAs.....	9
2.3.2	Übergangsmetall-katalysierte ringöffnende Polymerisation von NCAs .....	11
2.3.3	Synthese von Glycopolypeptiden.....	13
3	Lektine und ihre Wechselwirkungen mit Glycoproteinen .....	19
4	Synthese .....	22
4.1	Synthesestrategie .....	22
4.2	Synthese des Polypeptidrückgrats.....	23
4.2.1	Poly-Benzyl-L-glutamat (PBLG).....	23
4.2.2	Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure (PGA) .....	25
4.3	Synthese der Aminosucker .....	28
4.4	Anbindung der Aminosucker an das Polypeptidrückgrat.....	31
4.4.1	Anbindung von Glucosylamin.....	33
4.4.2	Anbindung von Di- und Trisacchariden .....	36
4.4.3	Synthese und Anbindung eines aromatischen Spacers (Glu-C <sub>ar</sub> -NH <sub>2</sub> ) .....	38
4.4.4	Bestimmung der Molekulargewichtsverteilungen der Glycopolypeptide.....	41
5	Circulardichroismus-Spektroskopie .....	43
5.1	Sekundärstrukturen von Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure .....	46
5.2	Sekundärstrukturen von Glycopolypeptiden .....	49
6	Lektin Wechselwirkungen .....	55

6.1	Quantitative Präzipitation .....	55
6.1.1	Quantitative Präzipitation am Beispiel von PGA-Maltobiose .....	57
6.1.2	Quantitative Präzipitation mit PGA-Glucose (DS 0.79, DP 62) .....	58
6.1.3	Quantitative Präzipitation mit PGA-C <sub>ar</sub> -Glucose .....	60
6.1.4	Vergleich der hergestellten Glycopolypeptide .....	62
6.1.5	Einfluss des Polymerisationsgrads .....	64
6.2	Isotherme Titrationskalorimetrie .....	65
6.2.1	Isotherme Titrationskalorimetrie von Glycopolypeptiden .....	68
7	Blockcopolymere .....	78
7.1	Synthese von PGA- <i>b</i> -pNIPAM .....	81
7.2	Synthese von PLL- <i>b</i> -pNIPAM .....	84
7.3	Untersuchungen zur Partikelbildung mittels dynamischer Lichtstreuung .....	87
7.3.1	Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	87
7.3.2	Temperaturabhängige Partikelgrößenmessungen .....	90
8	Zusammenfassung und Ausblick .....	96
9	Experimenteller Teil .....	100
9.1	Materialien .....	100
9.2	Methoden .....	102
9.3	Synthese der Aminosucker .....	110
9.3.1	β-D-Glucosylamin .....	110
9.3.2	β-D-Maltobiosylamin .....	111
9.3.3	β-D-Cellobiosylamin .....	112
9.3.4	β-D-Lactosylamin .....	113
9.3.5	β-D-Maltotriosylamin .....	114
9.4	Synthese des aromatischen Spacers (Glu- C <sub>ar</sub> -NH <sub>2</sub> ) .....	115
9.4.1	<i>N</i> -(4-(Aminomethyl)benzoyl)-β-D-glucosylamin (Glu-C <sub>ar</sub> -NH <sub>2</sub> ) .....	115

9.5	Synthese der Polypeptide .....	116
9.5.1	Poly-( $\gamma$ -Benzyl-L-glutamat) (PBLG) .....	116
9.5.2	Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure Natriumsalz (PGA-Na) .....	118
9.6	Polymeranaloge Funktionalisierung von PGA-Na mittels Amidkupplung .....	120
9.6.1	Allgemeine Synthesevorschriften .....	120
9.6.2	Funktionalisierung mit $\beta$ -D-Glucosylamin .....	121
9.6.3	Funktionalisierung mit $\beta$ -D-Maltobiosylamin .....	122
9.6.4	Funktionalisierung mit $\beta$ -D-Cellobiosylamin .....	123
9.6.5	Funktionalisierung mit $\beta$ -D-Lactosylamin .....	124
9.6.6	Funktionalisierung mit $\beta$ -D-Maltotriosylamin .....	125
9.6.7	Funktionalisierung mit dem aromatischen Spacer ( $C_{ar}$ -Glucose) .....	126
9.7	Synthese der Blockcopolymere .....	127
9.7.1	$N_6$ -Benzyloxycarbonyl-L-Lysin <i>N</i> -Carboxyanhydrid .....	127
9.7.2	PZLL- <i>b</i> -pNIPAM .....	128
9.7.3	PLL- <i>b</i> -pNIPAM .....	129
9.7.4	PBLG- <i>b</i> -pNIPAM .....	130
9.7.5	PGA-Na- <i>b</i> -pNIPAM .....	131
9.7.6	Glycosylierung von PGA-Na- <i>b</i> -pNIPAM .....	132
10	Literatur .....	133
11	Anhang .....	142

## Abkürzungsverzeichnis

ATR	abgeschwächte Totalreflexion, Messtechnik der IR-Spektroskopie
BLG	$\gamma$ -Benzyl-L-glutamat
BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl - Schutzgruppe für Amine
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)phosphonium Hexafluorophosphat
CD	Circulardichroismus
ConA	Concanavalin A
CRD	„carbohydrate recognition domain“ – Kohlenhydratbindungsstelle
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMT-MM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinchlorid
DP	„degree of polymerization“ – Polymerisationsgrad
DS	„degree of substitution“ – Substitutionsgrad
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure, Na-Salz
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimid Hydrochlorid
eq.	„equivalent“ – Äquivalent
F <sub>moc</sub>	Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe - Schutzgruppe für Amine
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot
Glu	$\beta$ -D-Glucose
Glu-C <sub>ar</sub> -NH <sub>2</sub>	N-(4-(Aminomethyl)benzoyl)- $\beta$ -D-glucosylamin – aromatischer Spacer
GPC	Gelpermeationschromatographie
HBS	„HEPES buffered saline“ – HEPES-gepufferte Salzlösung
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium Hexafluorophosphat
HDMT	2-Hydroxyl-4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin



HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMC	„half maximum concentration“
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HOBT	Hydroxybenzotriazol
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
LCST	„lower critical solution temperature“ – untere kritische Lösungstemperatur
Lys	Lysin
M/I	Monomer/Initiator
MALLS	„multi-angle laser light scattering“ – Mehrwinkellichtstreuung
MWCO	„molecular weight cut-off“
n. b.	nicht bestimmt
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrid
NCL	native chemische Ligation
NMR	„nuclear magnetic resonance“ - Kernspinresonanz
PBLG	Poly-( $\gamma$ -Benzyl-L-glutamat)
PGA	„poly-( $\alpha$ ,L-glutamic acid)“ - Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure
PGA-Na	Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure Natrium-Salz
PLL	Poly-L-lysin
pNIPAM	Poly- <i>N</i> -isopropylacrylamid
PZLL	Poly-( <i>N</i> - $\epsilon$ -carbobenzyloxyl-L-lysin)
RI	„refractive index“ – Brechungsindex
ROP	ringöffnende Polymerisation
RT	Raumtemperatur
SPPS	„solid phase peptide synthesis“ – Festphasenpeptidsynthese
TFA	Trifluoressigsäure

## Symbolverzeichnis

### NMR-Spektroskopie

$\delta$  chemische Verschiebung

ppm parts per million

### GPC

$\bar{M}_w$  Dispersität

$M_n$  Zahlenmittel des Molekulargewichts

$M_w$  Gewichtsmittel des Molekulargewichts

$P_n$  Polymerisationsgrad

### CD-Spektroskopie

A Absorbanz

c (Stoffmengen-)Konzentration

$c'$  Massenkonzentration

$\epsilon_L$  Extinktionskoeffizient links circular polarisierten Lichts

$\epsilon_R$  Extinktionskoeffizient rechts circular polarisierten Lichts

$f_\alpha$  Anteil  $\alpha$ -Helix im CD-Spektrum

$f_\beta$  Anteil  $\beta$ -Faltblatt im CD-Spektrum

$f_{coil}$  Anteil Zufallsknäuel im CD-Spektrum

$\theta$  Elliptizität

$[\theta]_M$  molare Elliptizität

$[\theta]_{MRW}$  mittlere molare Elliptizität einer Aminosäureeinheit

l Weglänge des Lichts/ Küvettenlänge

### Isotherme Titrationskalorimetrie

C-Wert	Maß für die Qualität einer ITC-Messung
$\Delta G$	Änderung der Gibb's Energie / freie Enthalpie
$\Delta H$	Bindungsenthalpieänderung
$K_a$	Assoziationskonstante
$K_d$	Dissoziationskonstante
[L]	Ligand
[M]	Bindungspartner
[LM]	Komplex aus Ligand und Bindungspartner
n	Anzahl der Bindungsstellen
R	ideale Gaskonstante
$\Delta S$	Entropieänderung
T	Temperatur

### Dynamische Lichtstreuung

D	Diffusionskoeffizient
d	Durchmesser
$\epsilon_0$	absolute Dielektrizitätskonstante des Mediums
$\epsilon_r$	relative Dielektrizitätskonstante des Mediums
$\zeta$	Zetapotential
$\eta$	Viskosität
I	Intensität des Lichts
$\lambda$	Wellenlänge des Lichts
$\mu_e$	elektrophoretische Mobilität

# 1 Einleitung

Glycoproteine sind an einer Vielzahl biologischer Signal- und Erkennungsprozesse beteiligt. Hierzu gehören Zell-Zell-Wechselwirkungen, wie beispielsweise die Befruchtung von Eizellen, aber auch Infektionsprozesse mit Viren und Bakterien. Diese Interaktionen basieren auf der molekularen Erkennung der Zuckerstrukturen des Glycoproteins durch zuckerbindende Proteine (Lektine).<sup>[1, 2]</sup> Die Wechselwirkungen zwischen den Glycoproteinen und den Lektinen ist hochspezifisch aber bis heute noch nicht vollständig verstanden. Ein Grund hierfür ist die Schwierigkeit Glycoproteine in Reinform zu isolieren beziehungsweise sie synthetisch herzustellen. Beides ist nur unter sehr hohem Aufwand möglich und liefert nur geringe Mengen an Glycoprotein.<sup>[3]</sup> Aufgrund der vielfältigen Prozesse im Organismus, an denen Glycoproteine beteiligt sind, sind sie aber vor allem für die pharmazeutische Industrie von Interesse. Daher wird zunehmend an synthetischen Glycoprotein-Mimetika geforscht - zum einen, um die Glycoprotein-Lektin-Wechselwirkung besser zu verstehen, zum anderen aber auch für direkte Anwendungen im biomedizinischen Bereich.<sup>[4, 5]</sup> So könnten Glycoprotein-Mimetika beispielsweise als Bestandteil eines Drug-Delivery-Systems für den spezifischen Wirkstofftransport oder direkt als polymere Wirkstoffe eingesetzt werden.<sup>[6, 7]</sup> Zu den Glycoprotein-Mimetika zählt eine Vielzahl von Strukturen, wie beispielsweise lineare oder verzweigte Glycopolymere oder Glycodendrimere. Eine besondere Klasse der Glycoprotein-Mimetika stellen jedoch Glycopolypeptide dar. Glycopolypeptide besitzen wie Glycoproteine auch die seltene Fähigkeit Sekundärstrukturen (z.B.  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt) auszubilden. Dies ist einzigartig unter den verschiedenen Glycoprotein-Mimetika und macht Glycopolypeptide zu besonders geeigneten Modell-Substanzen.

In den letzten Jahren gab es viele Fortschritte im Bereich der kontrollierten Synthese von Glycopolypeptiden. Allerdings beschränken sich die Ergebnisse meist nur auf Glycopolypeptide, die mit einfachen Monosacchariden ausgestattet sind. Über die Anbindung größerer Zuckerreste, und wie diese die Sekundärstrukturen der Glycopolypeptide beeinflussen, finden sich nur wenige Untersuchungen. Wie die Sekundärstrukturen durch die Anbindung größerer Zuckerreste beeinflusst werden, ist aber vor allem für die Entwicklung stimuli-responsiver Drug-Delivery-Systeme auf Glycopolypeptid-Basis interessant. Auch die Wechselwirkungen mit Lektinen wurden bisher überwiegend für Glycopolypeptide mit einfachen Monosacchariden erforscht. Die natürlichen Liganden der Lektine sind aber in der Regel

komplexere Zuckerstrukturen, sodass es sinnvoll wäre auch solche an Glycopolypeptide anzubinden.<sup>[1]</sup> Durch hohe Zuckerdichten an Monosacchariden lässt sich zwar die Wechselwirkung mit Lektinen verbessern und eine höhere Affinität verglichen mit dem Monosaccharid beobachten, interessant wäre es aber, ob größere Zuckerreste zu einer weiteren Affinitätssteigerung führen würden, da Oligosaccharide in der Regel von sich aus bereits eine höhere Affinität als Monosaccharide aufweisen.<sup>[8]</sup>

## 1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist, die Synthese von wohldefinierten Glycopolypeptiden, die nicht nur mit Monosacchariden sondern auch mit verschiedenen Di- und Trisacchariden funktionalisiert sind. Hierfür ist die Entwicklung einer einfachen Syntheseroute notwendig, um systematisch den Einfluss der unterschiedlich großen Zuckerreste auf die Sekundärstruktur der Glycopolypeptide untersuchen zu können. Es soll vor allem geklärt werden, ob größere Zuckerreste das Ausbilden von Sekundärstrukturen erlauben oder ob diese sich als störend erweisen. Neben dem Einfluss auf die Sekundärstrukturen werden die Wechselwirkungen der hergestellten Glycopolypeptide mit Lektinen untersucht (Abb. 1-1). Hierbei sind vor allem der Einfluss der Größe des Zuckerrestes sowie der Zuckerdichte und der Abstand des Zuckers vom Polypeptidrückgrat auf die Lektin-Wechselwirkung von Interesse. Ziel ist es, herauszufinden, ob größere Zuckerreste am Glycopolypeptid zu einer Verbesserung der Interaktion mit Lektinen führen und in wie weit der Abstand der Zucker vom Polypeptidrückgrat für die Lektinwechselwirkungen entscheidend ist.

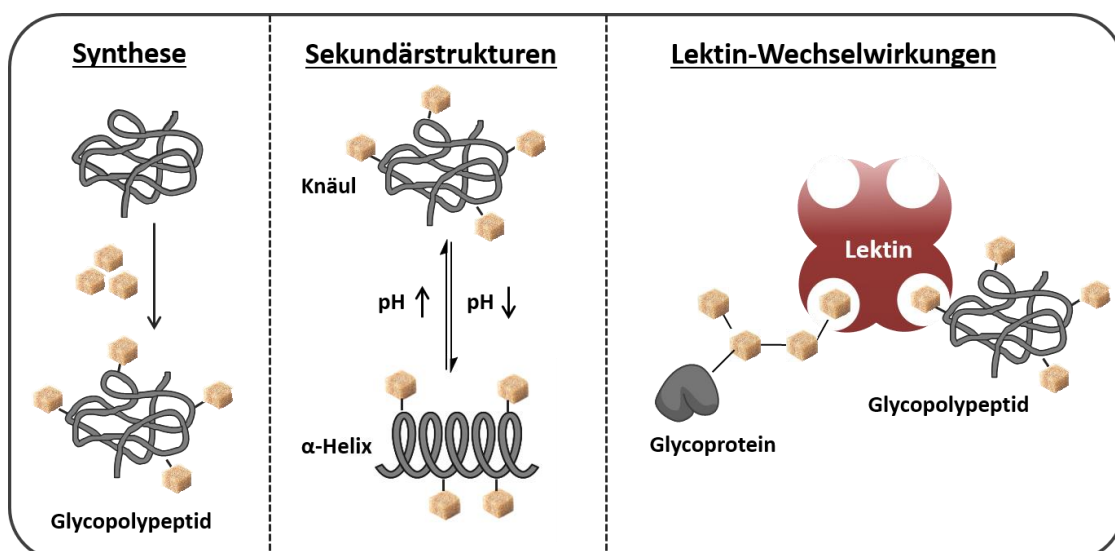


Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Glycopolypeptid-Synthese, der pH-abhängigen Ausbildung von Sekundärstrukturen und den Wechselwirkungen mit Lektinen

## 2 Glycoproteine und synthetische Analoga

### 2.1 Glycoproteine

Die Glycosylierung von Proteinen stellt einen der wichtigsten und komplexesten posttranskriptionalen Prozesse dar. So geht man heutzutage davon aus, dass etwa die Hälfte aller menschlichen Proteine glycosyliert vorliegt.<sup>[3]</sup> Hierfür gibt es verschiedene Gründe. Zum einen kann die Glycosylierung sowohl die Stabilität von Proteinen verbessern und vor Protolyse schützen, zum anderen kann sie die korrekte Faltung und somit die Konformation des Proteins unterstützen.<sup>[1]</sup> Darüber hinaus wird eine immense strukturelle Vielfalt durch die Zucker generiert<sup>1</sup>, die für verschiedene Signalprozesse und Erkennungsprozesse genutzt wird. So basiert beispielsweise das ABO-Blutgruppensystem auf unterschiedlichen Glycosylierungsmustern der Erythrozyten. Die Antigene der Blutgruppen A und B unterscheiden sich lediglich durch eine einzige Acetylgruppe an einem größeren Zuckerrest. Dieser kleine Unterschied ist jedoch bereits ausreichend, um von Antikörpern der jeweilig fremden Blutgruppe gebunden zu werden, wodurch es zum Verklumpen der Erythrozyten kommt.<sup>[9]</sup> Zu solchen Erkennungsprozessen die von Glycoproteinen gesteuert werden zählen aber auch verschiedene Zell-Zell-Wechselwirkungen, wie beispielsweise die Anbindung von Sperma an Eizellen und die Adhäsion von Pathogenen, wie Viren und Bakterien, an Zellmembranen des Wirtsorganismus.<sup>[1, 3, 10]</sup>

Die Glycosylierung von Proteinen im Organismus erfolgt entweder als N-Glycosylierung an Asparagin im Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums oder als O-Glycosylierung an OH-Gruppen von Serin oder Threonin. Bei der O-Glycosylierung werden die Zucker einzeln, nacheinander über verschiedene Glycosyltransferasen an das Protein angebracht, während bei der N-Glycosylierung größere, vorgefertigte Oligosaccharide an das Protein angebunden werden.<sup>[10, 11]</sup> Nach der primären Glycosylierung werden nach und nach bestimmte Zuckerreste wieder entfernt und andere hinzugefügt. Dies geschieht durch eine Vielzahl verschiedener Enzyme, die mit einander konkurrieren. Dadurch entstehen in der Regel verschiedene „Glycoformen“ eines Glycoproteins, die sich in ihrer Oligosaccharid-Struktur oder Verteilung unterscheiden.<sup>[1]</sup> Diese Mikroheterogenität erschwert es Glycoproteine zu trennen und in

---

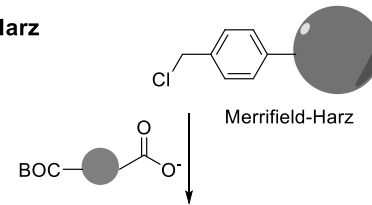
<sup>1</sup> Die strukturelle Vielfalt basiert auf der Möglichkeit unterschiedliche Monosaccharide in verschiedener Reihenfolge und Kettenlänge zu verknüpfen. Die Verknüpfung kann dabei an mehreren Stellen des Monosaccharids mit verschiedenen Konformationen ( $\alpha, \beta$ ) erfolgen. Außerdem kann die Verknüpfung sowohl linear als auch verzweigt sein. Darüber hinaus sind zusätzliche Modifikationen durch Sulfat-, Phosphat-, Acetyl- oder Methylgruppen an den Zuckern möglich, wodurch eine quasi unendliche Vielfalt an Strukturen entstehen kann.<sup>[1]</sup>

Reinform zu isolieren, da man hier an die Grenzen chromatographischer Trennmethoden stößt. Außerdem können auf diese Weise meist nur sehr geringe Mengen an Glycoprotein erhalten werden. Denkt man aber an einen pharmazeutischen Nutzen der Glycoproteine, sollte der Syntheseweg ausreichende Mengen Substanz liefern.

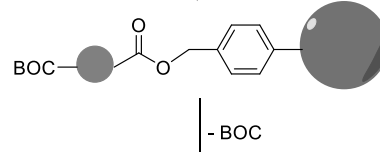
Eine Möglichkeit Glycoproteine künstlich herzustellen basiert auf biotechnologischen Methoden. Das erste Glycoprotein, das industriell rekombinant hergestellt werden konnte, ist das Erythropoetin – ein Hormon, das an der Bildung roter Blutkörperchen beteiligt ist und bei der Behandlung von Blutarmut eingesetzt wird. 1984 konnte es von SYLVIA LEE-HUANG durch Klonierung und Expression in *E. Coli* Bakterien hergestellt werden.<sup>[1, 12]</sup> Ein Nachteil der biotechnologischen Herstellung von Glycoproteinen liegt jedoch darin, dass häufig nur eukaryotische Zellen die komplexen Glycosylierungen durchführen können, was aber wiederum zur Ausbildung verschiedener Glycoformen führen kann. Außerdem hängt das Glycosylierungsmuster stark vom verwendeten Zelltyp ab, sodass je nach verwendetem Organismus unterschiedliche Produkte erhalten werden.<sup>[3, 13]</sup>

Eine weitere Möglichkeit für die synthetische Herstellung von Glycoproteinen ist die Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis – SPPS). Bei der Festphasenpeptidsynthese handelt es sich um ein von MERRIFIELD entwickeltes Verfahren zur sequenzkontrollierten Herstellung von Peptiden (s. Abb. 2-1).<sup>[14]</sup> Hierfür wird ein fester Träger (Merrifield-Harz) verwendet, der in allen Lösungsmitteln der Peptidsynthese unlöslich ist. An diesen Träger wird in einer ersten Reaktion eine am *N*-Terminus geschützte Aminosäure angebunden. Die Schutzgruppe am *N*-Terminus wird daraufhin abgespalten und das Merrifield-Harz ausgiebig gewaschen. Anschließend wird die zweite Aminosäure zugegeben, deren *N*-Terminus wiederum geschützt ist. Der *C*-Terminus der zweiten Aminosäure wird mit einem Amidkupplungsreagenz (z.B. DCC) aktiviert und an die auf dem Merrifield-Harz immobilisierte Aminosäure angebunden. Diese Schritte werden solange wiederholt bis die gewünschte Aminosäuresequenz erreicht ist. Abschließend wird das fertige Peptid vom Träger abgespalten und aufgereinigt.<sup>[14]</sup>

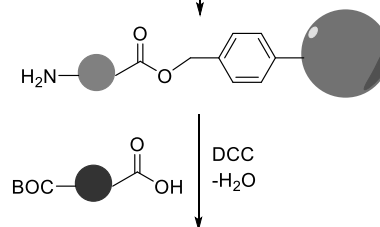
## 1. Anbindung der ersten Aminosäure an das Merrifield-Harz



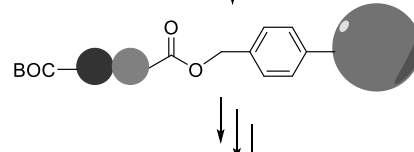
## 2. Entschützung des N-Terminus



## 3. Anbindung der zweiten Aminosäure



## 4. Wiederholung der Schritte 2 &amp; 3



## 5. Abspaltung vom Merrifield-Harz

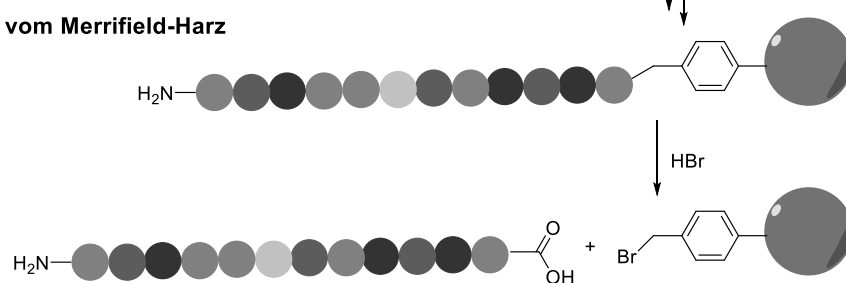
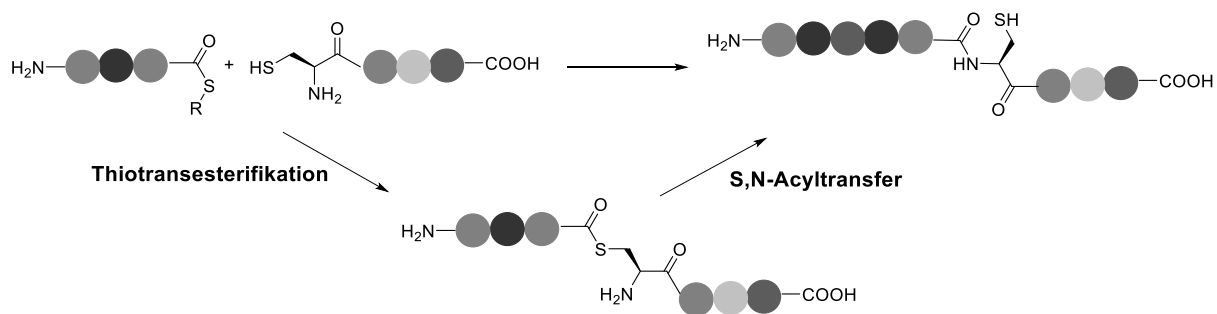


Abb. 2-1 Prinzip der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nach MERRIFIELD

Für die Herstellung von Glycoproteinen können entweder direkt glycosylierte Aminosäuren eingesetzt werden<sup>[15–17]</sup>, oder die Zucker werden im Anschluss an das fertige Peptid angebunden.<sup>[17]</sup> Die Verwendung von glycosylierten Aminosäuren erfordert jedoch im Vorfeld der SPPS eine meist aufwendige Synthese der funktionalisierten Aminosäuren. Darüber hinaus müssen sämtliche OH-Gruppen der Zucker geschützt werden. Die Schutzgruppen müssen hierbei mit Bedacht gewählt werden, da sie nicht versehentlich während der SPPS entfernt werden oder bei der späteren Spaltung das fertige Peptid beeinflussen dürfen (z.B. Epimerisierung). Aber auch die nachträgliche Anbringung von Zuckern an das fertige Peptid birgt Nachteile. Eine spezifische Anbindung der Zucker erfordert wiederum den Schutz des Peptids und oft wasserfreie Bedingungen.<sup>[17]</sup> Außerdem haben beide Wege generelle Nachteile der SPPS. So ist die Peptidlänge meist auf ca. 50 Aminosäureeinheiten beschränkt, da die Ausbeute der Methode mit zunehmender Kettenlänge drastisch abnimmt.<sup>[3]</sup> Eine Synthese komplexer Glycoproteine ist daher auf diesem Weg allein bisher nicht möglich. Eine Möglichkeit



besteht jedoch darin die SPPS mit der nativen chemischen Ligation (NCL) zu verbinden.<sup>[3, 18]</sup> Mittels NCL können zwei Peptidketten miteinander verknüpft werden. Eine Peptidkette muss hierfür an ihrem C-Terminus einen Thioester besitzen, während die zweite Peptidkette am N-Terminus einen Cysteinrest trägt (s. Abb. 2-2). Es kommt zu einer Thiotransesterifikation am Cystein gefolgt von einer Umlagerung zum Peptid (S,N-Acyl-Transfer). Auf diese Weise könne mehreren kurze Peptidketten zu längeren Peptiden bzw. Proteinen verknüpft werden. Allerdings ist Cystein eine Aminosäure, die in humanen Proteinen vergleichsweise selten vorkommt (schätzungsweise 1.5-2 %), weshalb an anderen chemischen Ligationen geforscht wird.<sup>[3]</sup>

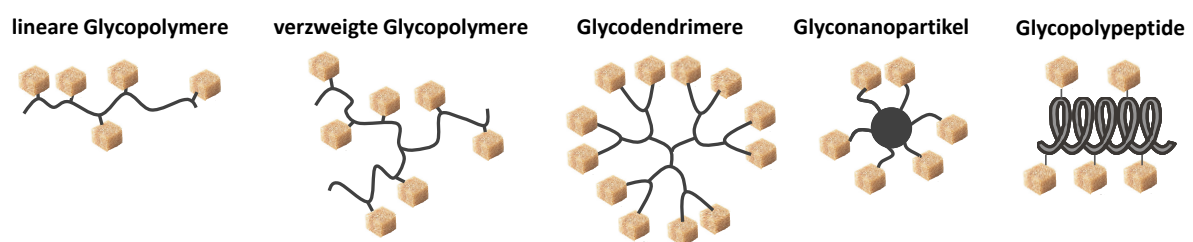


**Abb. 2-2 Prinzip der Nativen Chemischen Ligation (NCL)**

Heutzutage stehen daher zwar verschiedene chemische und biotechnologische Methoden für die Herstellung von Glycoproteinen bzw. Glycopeptiden zur Verfügung, die Synthese komplexer Glycoproteine in Reinform ist jedoch nach wie vor schwierig, teuer und liefert nur geringe Ausbeuten. Daher wird zunehmend an Glycoprotein-Mimetika geforscht, die die biologische Aktivität der natürlichen Glycoproteine imitieren sollen, aber deutlich einfacher herzustellen sind.

## 2.2 Synthetische Glycoprotein Mimetika

Als synthetische Glycoprotein Mimetika zählen eine Vielzahl von Strukturen, die versuchen bestimmte Funktionen oder Eigenschaften von Glycoproteinen nachzuahmen. Häufig wird dabei versucht ihre biologischen Funktionen und die spezifische Kohlenhydrat-Lektin Wechselwirkungen zu imitieren. Dies kann zum einen dem besseren Verständnis von Glycoproteinen und ihren Aufgaben im Organismus dienen, zum anderen können diese Strukturen aber auch als ein Ersatz für natürliche Glycoproteine im pharmazeutischen Bereich eingesetzt werden.<sup>[5]</sup>



**Abb. 2-3 Beispiele für verschiedene Architekturen von Glycoprotein Mimetika**

Glycoprotein Mimetika bestehen meist aus einem Gerüst an das lateral mehrere Zucker angebunden sind. Hierbei sind verschiedene Architekturen möglich (s. Abb. 2-3). Am häufigsten sind lineare Glycopolymere, da diese am leichtesten synthetisch zugänglich sind.<sup>[19]</sup> Es gibt aber eine Vielzahl anderer Strukturen, die in der Literatur beschrieben sind, wie beispielsweise sphärische Architekturen in Form von Glycodendrimeren<sup>[20–23]</sup> und Glyconanopartikeln<sup>[24–27]</sup> oder eher stäbchenartige Strukturen, z.B. durch Glycopolypeptide. Darüber hinaus können noch übergeordnete Strukturen wie Mizellen, Polymersome oder Vesikel generiert werden.<sup>[28–30]</sup>

Durch die Vielzahl an Zucker-Bausteinen auf dem Gerüst kann die Wechselwirkung der Zucker mit ihrem natürlichen Liganden oder Lektinen deutlich gesteigert werden. Glycoprotein Mimetika könnten daher als polymere Wirkstoffe dienen, die beispielsweise die Bindungsstellen von Pathogenen oder Toxinen blockieren und so Infektionen und Vergiftungen unterdrücken. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Glycopolymere, die Galactosereste tragen, in der Lage sind das Cholera Toxin zu inhibieren.<sup>[31, 32]</sup>

Da Glycoproteine häufig in Zellmembranen auftreten und an der Wechselwirkung mit anderen Zellen beteiligt sind, liegt eine weitere mögliche Anwendung für Glycoprotein Mimetika in der Zellkultivierung und als Gerüst für Gewebezüchtung (*tissue engineering*). Beispielswei-

se konnten KOBAYASHI et al. zeigen, dass mit Lactose funktionalisiertes Polystyrol (PVLA) sowohl die Adhäsion als auch die Proliferation von Hepatozyten auf mit PVLA beschichtetem Zellkultursubstrat über die spezifische Wechselwirkung zwischen den Zuckern am Polymer und dem Asialoglycoprotein-Rezeptor der Hepatozyten begünstigt.<sup>[33]</sup>

Weitere Anwendungen der Glycoprotein Mimetika können in biologischen Sensorsystemen als molekulare Erkennungseinheiten liegen und damit bei ausreichender Stärke der Interaktion eine Alternative zu Antikörpern darstellen.<sup>[5]</sup> So könnten Glycopolymere beispielsweise als zellspezifische Drug-Delivery-Systeme eingesetzt werden, da einige Zelltypen wie z.B. Hepatozyten über Rezeptoren für bestimmte Zuckerstrukturen (Hepatozyten: Galactose) verfügen.<sup>[33]</sup> Je nach Architektur der Glycoprotein-Mimetika sind auch Einlagerungen von Wirkstoffen möglich. So konnten beispielsweise Glycopolymer Mizellen hergestellt werden, in die Doxorubicin eingelagert wurde. Diese Mizellen konnten *in vitro* über Galactosereste von Hepatozyten (HepG2 Zellen) gebunden und aufgenommen werden und das Doxorubicin freisetzen.<sup>[34]</sup> Für detailliertere Informationen zu den verschiedenen Anwendungsfeldern von Glycoprotein Mimetika sei auf weiterführenden Literatur verwiesen.<sup>[5–7]</sup>

## 2.3 Synthetische Glycopolypeptide

Von den verschiedenen Glycoprotein Mimetika stellen Glycopolypeptide eine besonders interessante Klasse dar. Durch das Polypeptidrückgrat ist die Ähnlichkeit zu Glycoproteinen, die ebenfalls über ein Peptidrückgrat verfügen, besonders groß. Weitere Vorteile gegenüber synthetischen Polymeren liegen zum einen darin, dass sie biodegradabel sind und zum anderen in ihrer Fähigkeit Sekundärstrukturen (z.B.  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt) auszubilden. Die gängigste Methode synthetische Polypeptide herzustellen, basiert auf der erstmals 1906 von HERMANN LEUCHS beschriebene Polymerisation von N-Carboxyanhydriden (NCAs).<sup>[35–37]</sup> Da zum damaligen Zeitpunkt die vorherrschende Meinung die Existenz kovalenter Makromoleküle ausschloss, wurden die Produkte der NCA Polymerisation noch als Anhydride von Aminosäuren bezeichnet und für Aggregate niedermolekularer Verbindungen gehalten.<sup>[37, 38]</sup> Der eigentliche Durchbruch der ringöffnenden Polymerisation (ROP) von N-Carboxyanhydriden trat erst in den 1920er Jahren ein, als HERMANN STAUDINGERS Konzept kovalenter Makromoleküle zunehmend Akzeptanz fand.<sup>[38, 39]</sup> Damals stellten T. CURTIUS<sup>[40–42]</sup> und F. WESSELY<sup>[43–46]</sup> die Prämisse auf, dass es sich bei den Produkten der NCA Reaktion mit Wasser, Alkoholen und

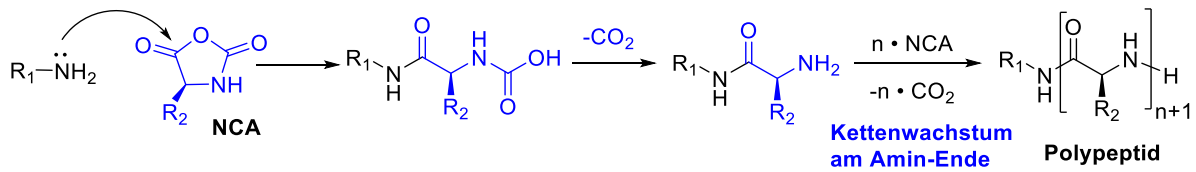
primären Aminen um hochmolekulare Polypeptide handelt. Seit damals wurde die ringöffnende Polymerisation von N-Carboxyanhydriden ausgiebig erforscht und verbessert, sodass heutzutage verschiedene kontrollierte Reaktionstechniken zur Verfügung stehen, die definierte Polypeptide mit engen Molekulargewichtsverteilungen ( $\bar{D} < 1.2$ ) liefern.<sup>[38]</sup> Die am häufigsten verwendeten Polymerisationstechniken sind die über primäre Amine initiierte und die Übergangsmetall-katalysierte, ringöffnende Polymerisation von NCAs. Beide Techniken können auch für die Synthese von glycosylierten Polypeptiden eingesetzt werden und werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

### 2.3.1 Amin-initiierte ringöffnende Polymerisation von NCAs

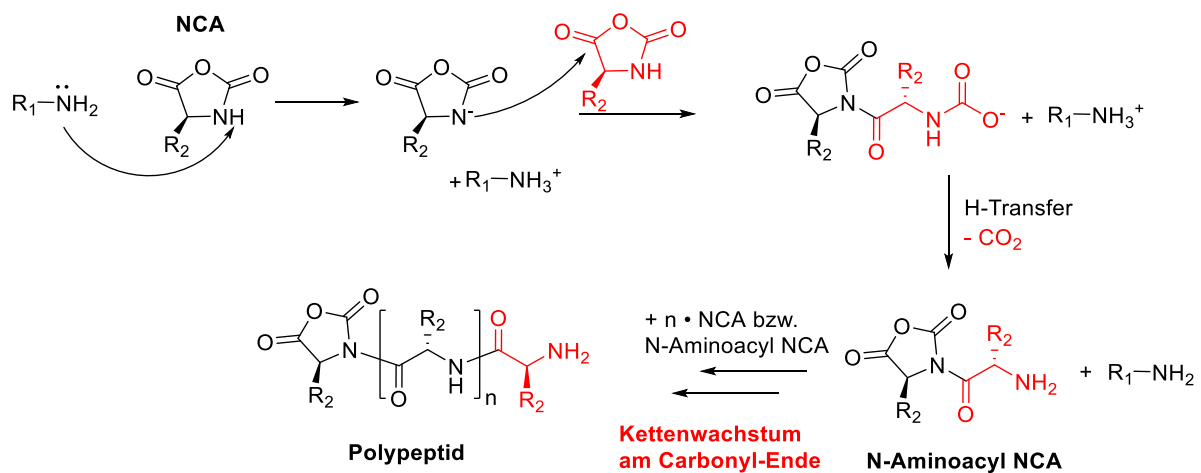
Klassische Methoden für die Polymerisation von Aminosäure-NCAs sind die Verwendung von Nukleophilen und Basen als Initiatoren. Basische Initiatoren, wie tertiäre Amine und Alkoxide, können zwar Polypeptide mit sehr hohen Molekulargewichten liefern, allerdings verläuft die Reaktion eher unkontrolliert über den Aktiviertes-Monomer-Mechanismus (s. Abb. 2-4, unten).<sup>[47]</sup> Bei diesem Mechanismus entsteht als Zwischenstufe ein Aminoacyl-NCA, das sowohl mit weiteren NCA-Monomeren aber auch mit anderen Aminoacyl-NCA Zwischenstufen (Oligopeptide) reagieren kann, wodurch kein lineares Kettenwachstum gegeben ist. Daher werden primäre Amine häufiger als Initiatoren eingesetzt. Diese verhalten sich eher nukleophil als basisch und reagieren kontrolliert nach dem Amin-Mechanismus (s. Abb. 2-4, oben). Hierbei greift das primäre Amin im ersten Reaktionsschritt nukleophil an die C<sub>5</sub>-Carbonylfunktion des NCAs an. Dadurch kommt es zur Ringöffnung und zur Freisetzung von CO<sub>2</sub>, wodurch erneut ein primäres Amin am wachsenden Kettenende erzeugt wird. Wenn keine Nebenreaktionen auftreten, kann das freie Amin am Kettenende mit weiteren NCA-Monomeren reagieren, sodass das Kettenwachstum linear zum Monomerverbrauch verläuft. Bei diesem Reaktionsmechanismus werden zwar niedrigere Polymerisationsgrade erreicht als über den Aktiviertes-Monomer-Mechanismus, durch die kontrollierte Reaktion aber Polypeptide mit engen Molekulargewichtsverteilungen erhalten. Gängige Initiatoren, die häufig verwendet werden und vorwiegend nach dem Amin-Mechanismus reagieren, sind *n*-Hexylamin und Benzylamin.<sup>[48–51]</sup> Es können aber auch primäre Amine mit funktionellen Gruppen, wie Propargylamin, eingesetzt werden. Dies ist vor allem deshalb interessant, da der Initiator die Endgruppe des Polypeptids darstellt und somit spätere Funktionalisierungen (z.B. in Form von Blockcopolymeren oder Sternpolymeren) ermöglicht.<sup>[52, 53]</sup> Ein neuer Ansatz ist die Verwendung von Photoinitiatoren auf Carbamat-Basis, wie beispielsweise 2,6-dinitro-

benzylcyclohexylcarbamate. Das primäre Amin (hier: Cyclohexylamin) wird erst in der Reaktion *in situ* durch UV-Bestrahlung generiert.<sup>[54]</sup>

### Amin-Mechanismus

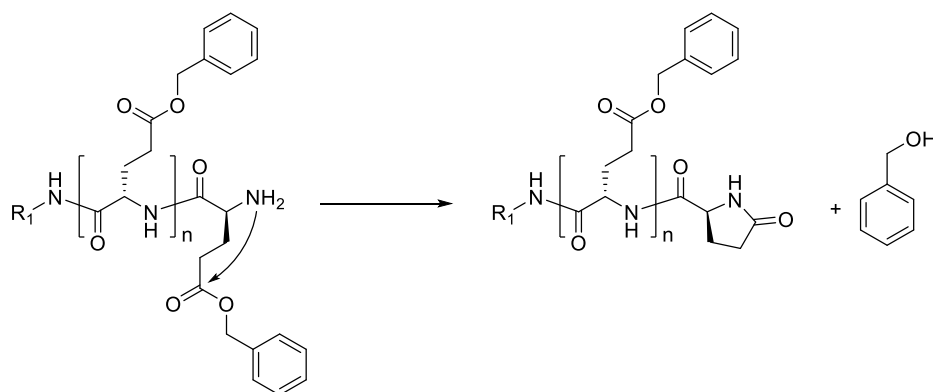


### Aktiviertes Monomer Mechanismus



**Abb. 2-4 Mechanismen der NCA Polymerisation mit primären Aminen – oben: Amin-Mechanismus, unten: Aktiviertes Monomer Mechanismus**

Zu beachten ist, dass auch bei der Verwendung von primären Aminen als Initiatoren innerhalb einer Polymerisation immer beide Mechanismen ablaufen können und der Mechanismus auch innerhalb einer wachsenden Polymerkette wechseln kann, da beide Mechanismen jeweils Nebenreaktionen von einander darstellen.<sup>[47]</sup> Verläuft das Kettenwachstum vorwiegend über den Amin-Mechanismus, lässt sich der Polymerisationsgrad über das Monomer/Initiator-Verhältnis (M/I) einstellen. Da aber während der Reaktion primäre Amine, Carbamate und NCA-Anionen als Endgruppen vorliegen können, können eine Reihe von ungewollten Nebenreaktionen ablaufen. Hinzu kommt, dass geringe Verunreinigungen des Monomers und Spuren von Wasser zu Kettenabbrüchen führen können.<sup>[47, 51]</sup> Im Falle von Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure kann es zusätzlich noch zu intramolekularen Terminierungsreaktionen durch Endgruppenzyklisierung unter Ausbildung eines Pyroglutamats kommen (s. Abb. 2-5).<sup>[51]</sup>



**Abb. 2-5 intramolekulare Terminierungsreaktion bei der Polymerisation von Poly-Benzyl-L-glutamat durch Endgruppen Zyklisierung**

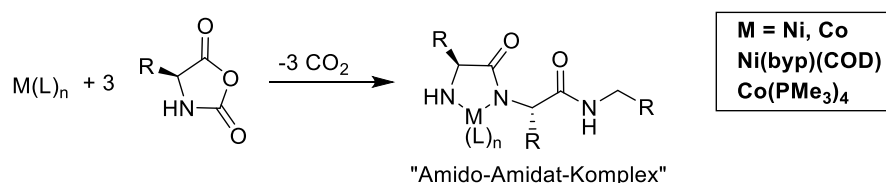
Aufgrund der Vielzahl an möglichen Nebenreaktionen wurden verschiedenen Techniken entwickelt, um diese möglichst gering zu halten. Dazu gehören beispielsweise Hochvakuum-Techniken<sup>[49, 55]</sup>, die Initiierung mit Silazanen<sup>[56]</sup>, sowie die Verwendung von Aminhydrochloriden, um das im Aktiviertes-Monomer-Mechanismus entstehende NCA-Anion zu reprotonieren.<sup>[57, 58]</sup> Die einfachste Möglichkeit ist es jedoch die Polymerisation bei reduzierter Temperatur durchzuführen. So konnten VAYABOURY et. al. über Kapillar-Elektrophorese zeigen, dass bei Reduzierung der Reaktionstemperatur auf 0 °C die Amin-Endgruppe in 99 % der Peptidketten erhalten bleibt.<sup>[48, 59]</sup> Erklärt wird dies dadurch, dass bei 0 °C vor allem die Nebenreaktion mit dem Lösungsmittel DMF und die Formamid-Bildung unterdrückt werden. Durch die reduzierte Temperatur verlängern sich jedoch die Reaktionszeiten und hohe Molekulargewichte sind nach wie vor nicht zugänglich. Nichtsdestotrotz ist dieser Ansatz sehr vielversprechend, da er keiner komplizierten Reaktionsaufbauten oder empfindlichen Reagenzien, wie Übergangsmetall-Katalysatoren, bedarf.<sup>[51]</sup>

### 2.3.2 Übergangsmetall-katalysierte ringöffnende Polymerisation von NCAs

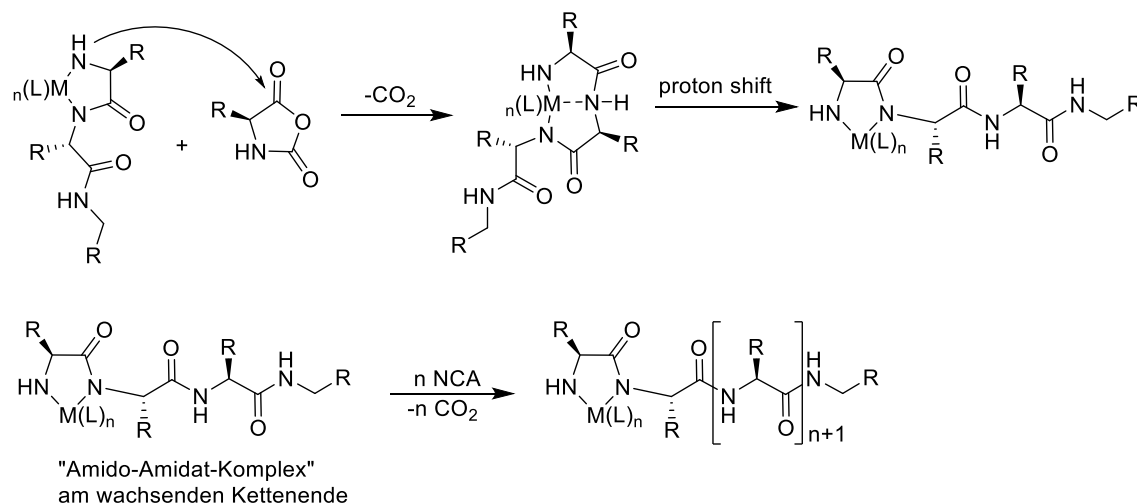
Eine Möglichkeit Polypeptide mit hohen Molekulargewichten herzustellen, ist die Verwendung von Übergangsmetall-Initiatoren. Während der NCA-Polymerisation bildet sich ein Komplex mit dem Übergangsmetall-Initiator aus, der Nebenreaktionen unterdrückt und nur kontrollierte Monomer-Addition zulässt, wodurch deutlich höhere Molekulargewichte und schnellere Reaktionszeiten als bei der Verwendung von primären Aminen erzielt werden können.<sup>[50]</sup> Übergangsmetall-Initiatoren für die NCA Polymerisation wurden erstmals 1997 von DEMING et. al. beschrieben.<sup>[60]</sup> Seit dem wurden verschiedene Übergangsmetall-Initiatoren entwickelt und eine Vielzahl von NCAs kontrolliert polymerisiert ( $\bar{D} < 1.2$ ). Häufig

handelt es sich bei den Initiatoren um  $\text{Ni}^0$ - und  $\text{Co}^0$ -Komplexe, wie  $\text{bipyrNi(COD)}^{[60, 61]}$  und  $\text{Co(PMe}_3)_4$ .<sup>[62, 63]</sup> Mechanistische Untersuchungen zeigten, dass zunächst drei NCAs mit dem Übergangsmetall-Komplex reagieren müssen, bevor sich ein Amido-Amidat-Komplex ausbildet, der als reaktive Zwischenstufe der Reaktion gilt (s. Abb. 2-6).<sup>[50]</sup> Die nukleophile Amidogruppe des Amido-Amidat-Komplexes greift die  $\text{C}_5$ -Carbonylfunktion des NCAs an, wodurch sich ein größerer Komplex bildet. Dieser Komplex reagiert unter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung und Protonentransfer zurück zum Amido-Amidat-Komplex, sodass sich dieser immer am wachsenden Kettenende befindet.<sup>[50]</sup>

#### Beginn der Reaktion:



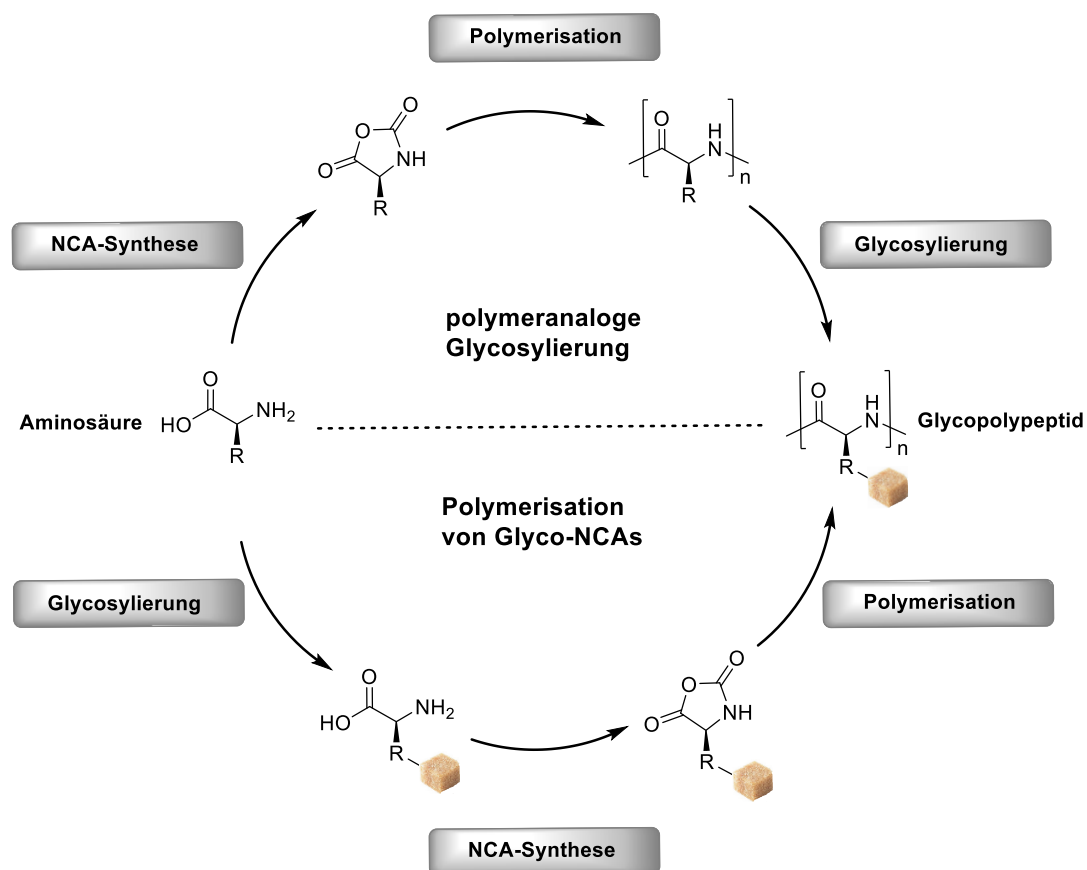
#### Kettenwachstum durch Anlagerung weiterer NCA-Monomere:



**Abb. 2-6 Mechanismus der NCA-Polymerisation mit Übergangsmetall-Initiatoren**

Durch den Amido-Amidat-Komplex am wachsenden Kettenende werden Nebenreaktionen, die zu einem Abbruch des Kettenwachstums führen unterdrückt. Mit Ni- und Co-Komplexen können daher Polypeptide mit Molekulargewichten von bis zu 500,000 g/mol und niedrigen Polydispersitäten ( $\text{Đ} < 1.2$ ) hergestellt werden.<sup>[50]</sup> Allerdings sind die Übergangsmetall-Initiatoren sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff, weshalb sehr stark auf die Reaktionsbedingungen geachtet werden muss.

## 2.3.3 Synthese von Glycopolypeptiden



**Abb. 2-7 Syntheschema für die zwei Syntheserouten von Glycopolypeptiden**  
oben: polymeranalogue Glycosylierung, unten: Polymerisation von glycosylierten NCAs

Grundsätzlich stehen zwei verschiedene Ansätze für die Herstellung von Glycopolypeptiden zur Verfügung (s. Abb. 2-7).<sup>[64, 65]</sup> Es besteht die Möglichkeit, glycosylierte NCAs herzustellen und diese zu polymerisieren. Hierbei werden Glycopolypeptide mit einem Glycosylierungsgrad von 100 % erhalten, es sei denn, man führt eine Copolymerisation mit einer Mischung aus unglycosylierten und glycosylierten NCAs durch. Ein Nachteil der Methode liegt jedoch darin, dass für jeden Zucker, der ans Polypeptid angebracht werden soll, ein eigener Syntheseweg für das entsprechende NCA entwickelt werden muss. Darüber hinaus müssen die Zucker während der Synthese der NCAs und der Polymerisation geschützt werden und später am Polypeptid wieder entschützt werden, wodurch der synthetische Aufwand dieses Herstellungswegs vergleichsweise hoch ist. Außerdem ist die Einstellung des Glycosylierungsgrades über Copolymerisation häufig nicht einfach. Wenn sich die Reaktivitäten der unterschiedlichen NCAs deutlich voneinander unterscheiden, wird eines der Monomere in der Polymerisation bevorzugt eingebaut ( $r$ -Parameter  $\neq 1$ ). Dies führt dazu, dass die Verteilung der Zucker auf dem Peptidrückgrat nicht statistisch erfolgt und man einen Gradienten in der



Glycosylierung auf dem Peptidrückgrat erhält.<sup>[66–68]</sup> Nichtsdestotrotz gibt es in der Literatur einige Ansätze, die Polymerisationen von Glyco-NCAs beschreiben.<sup>[3, 64, 69–71]</sup> Erstmals untersucht wurde die Polymerisation von Glyco-NCAs 1994 von OKADA et al.. Sie polymerisierten ein Serin-NCA, an das O-glycosidisch Acetyl- $\beta$ -D-Glucose angebunden war, sowohl mit tertiären als auch mit primären Aminen als Initiatoren. Es wurden jedoch nur geringe Polymerisationsgrade zwischen 14–26 Wiederholungseinheiten erhalten.<sup>[69]</sup> Seit dem wurde die Polymerisation von Glyco-NCAs weiter entwickelt, sodass heute auch Glycopolypeptide mit höheren Molekulargewichten über diesen Ansatz hergestellt werden können. So beschreiben DEMING et al. eine 5-stufige Synthese für verschiedene auf Lysin basierende Glyco-NCAs mit denen Übergangsmetall-katalysiert Molekulargewichte > 100,000 g/mol erzielt werden konnten.<sup>[70]</sup> Allerdings sind durch die mehrstufigen Synthesen der NCAs die Gesamtausbeuten der Reaktionen sehr gering (< 25%).

Die zweite Möglichkeit Glycopolypeptide herzustellen, ist die polymeranaloge Glycosylierung von Polypeptiden (s. Abb. 2-7). Hierbei wird zunächst ein Polypeptidrückgrat ausgehend von Aminosäure-NCAs hergestellt, die funktionelle Gruppen in den Seitenketten tragen. Diese können dann im Anschluss an die Polymerisation mit Zuckern modifiziert werden. Der Vorteil hierbei ist, dass nur ein einziges NCA synthetisiert und polymerisiert werden muss, weil die Zucker nachträglich angebracht werden. Hierdurch reduziert sich der Syntheseaufwand und die Verwendung von Schutzgruppen wird in vielen Fällen unnötig, da die Zucker erst im letzten Reaktionsschritt eingebracht werden. Für den Ansatz der polymeranalogen Glycosylierung können zwei verschiedenen Arten von Aminosäure-NCAs eingesetzt werden: Synthetische Aminosäure-NCAs, die funktionelle Gruppen in den Seitenketten tragen, die für Click-Chemie geeignet sind (z.B. Alkine, Azide) oder NCAs, die auf natürlichen Aminosäuren, wie Polyglutaminsäure oder Polylysin, basieren und von sich aus über funktionelle Gruppen (COOH, NH<sub>2</sub>) verfügen.

Synthetische Aminosäure-NCAs wurden bereits von verschiedenen Gruppen erfolgreich über ringöffnende Polymerisation polymerisiert und über HUISGEN [3+2] Cycloaddition glycosyliert.<sup>[72–75]</sup> So konnte beispielsweise das D,L-Propargylglycin-NCA von A. HEISE und Mitarbeitern erfolgreich mit Amin-Initiatoren über eine ROP polymerisiert und mit Poly-Benzyl-L-glutamat-NCA copolymerisiert werden. Es wurden wohldefinierte Polypeptide mit engen Molekulargewichtsverteilungen ( $\bar{M}_w/\bar{M}_n < 1.3$ ) erhalten, an die über Click-Chemie Azid-

funktionalisierte Galactose angebunden werden konnte. Allerdings weisen die synthetischen Homopolyptide eine schlechte Wasserlöslichkeit bei größeren Kettenlängen auf. Die glycosylierten Polypeptide zeigten zwar eine bessere Wasserlöslichkeit, bildeten jedoch  $\beta$ -Faltblattstrukturen und Aggregate in Lösungen aus.<sup>[72]</sup> Der umgekehrte Ansatz sieht die Kupplung von Azid-funktionalisierten Polypeptiden mit alkinylierten Zuckern vor. So konnten DEMING et. al. Azid-enthaltende synthetische Aminosäure-NCAs (Azidonorvalin und Azidonorleucin) Übergangsmetall-katalysiert mit  $(\text{PMe}_3)_4\text{Co}$  als Initiator polymerisieren und über Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Click-Chemie verschiedene alkinylierte Verbindungen, darunter auch ein Monosaccharid, anbinden.<sup>[75]</sup>

Neben der Azid-Alkin Click-Chemie gibt es auch Ansätze zu Thiol-En und Thiol-Yne Reaktionen, um Zucker an synthetische Polypeptide zu kuppeln.<sup>[76–78]</sup> So konnten SCHLAAD und Mitarbeiter D,L-Allylglycin-NCA amin-initiiert polymerisieren und über radikalische Thiol-En Reaktionen sowohl thermisch als auch photochemisch 1-Thio- $\beta$ -D-Glucopyranose und das O-Acetyl-geschützte Derivat durch Click-Chemie anbringen.<sup>[76]</sup> Darüber hinaus konnten Copolypeptide aus  $\gamma$ -Benzyl-L-glutamat und D/L-Propargylglycin hergestellt werden, deren Alkingruppe theoretisch zwei Thiozucker über Thiol-Yne Kupplung addieren kann. Reaktionen der Copolypeptide ergaben jedoch maximal 1.4 Glucoseeinheiten je Propargylgruppe, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die Anbindung der zweiten Thioglucose sterisch gehindert wird.<sup>[77]</sup>

Neben den synthetischen Polypeptiden gibt es auch Ansätze, die Click-Chemie an der natürlichen Aminosäure Cystein durchführen.<sup>[79, 80]</sup> Der Nachteil hierbei ist jedoch, dass Homopolyptide aus Cystein  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausbilden und eine schlechte Löslichkeit besitzen, die häufig auch die Polymerisationsgrade limitiert, da die wachsenden Polypeptide während der Polymerisation ausfallen.<sup>[38]</sup>

Obwohl Click-Reaktionen meist hoch-effizient sind, birgt die Methode auch einige Nachteile gegenüber der Verwendung natürlicher Aminosäure-NCAs. NCAs, die Alkin-, Alken- oder Azidgruppen tragen, sind auch mit Übergangsmetall-Katalysatoren auf Grund von Nebenreaktionen häufig nicht in der Lage hochmolekulare Polypeptide auszubilden. Außerdem ist das im Falle der Azid-Alkin Click-Reaktion entstehende Triazol kein Bindungsmuster, das auch in natürlichen Glycoproteinen auftreten würde. Die Verwendung von NCAs, die auf natürlichen Aminosäuren wie Poly-L-glutaminsäure und Poly-L-lysin basieren, hat darüber hinaus

den Vorteil, dass sowohl die Übergangsmetall-katalysierte als auch die Amin-initiierte Polymerisation bereits ausgiebig erforscht und etabliert sind. Hierbei werden in der Regel geschützte Aminosäuren-NCAs eingesetzt (z.B. das  $\epsilon$ -Benzyloxycarbonyl-L-lysin-NCA und das Poly-Benzyl-L-glutamat-NCA). Nach der Polymerisation wird die Schutzgruppe abgespalten und das freie Amin bzw. die freie Carbonsäure erhalten, an die dann Zucker über klassische Kupplungs-Methoden angebunden werden können. Eine Möglichkeit Zucker an kationische Polypeptide, wie Poly-L-lysin, anzubinden stellen beispielsweise zuckerhaltige Isothiocyanate dar. So beschreiben MIDOUX et. al.<sup>[81]</sup> die Anbindung von Lactose und Mannose und WANG et. al.<sup>[82]</sup> die Anbindung eines mannosehaltigen Isothiocyanats an Poly-L-lysin unter Ausbildung einer Thioharnstoff-Bindung. Die resultierenden Mannose-haltigen Polypeptide mit Substitutionsgraden von 16 % und 23 % waren interessanterweise in der Lage pH-abhängig sphärische Mizellen und Vesikel in wässriger Lösung auszubilden.<sup>[82]</sup> Weitere Beispiele Zucker an Poly-L-lysin anzubinden, sind die Reaktionen mit D-Gluconolacton und Lactobionolacton in der Gegenwart von Diisopropylethylamin<sup>[83]</sup> sowie die Anbindung von Lactobionsäure mit 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimid Hydrochlorid (EDC).<sup>[84]</sup>

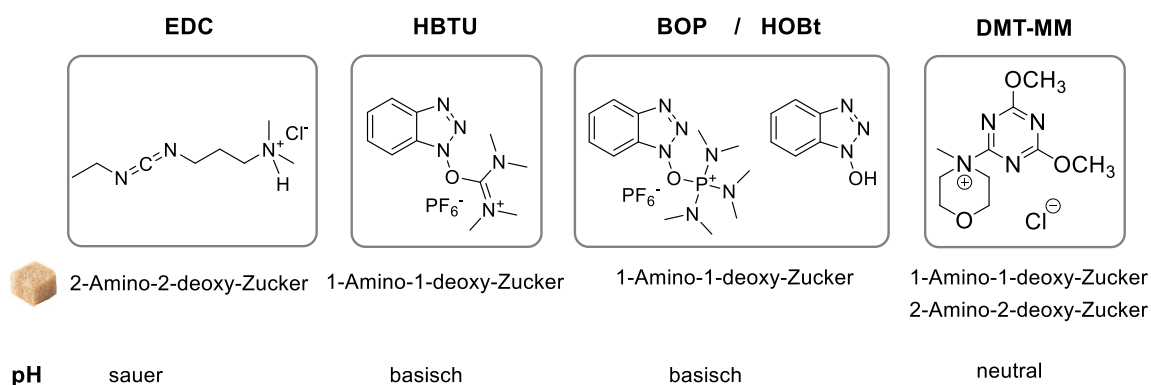
Anionische Polypeptide, wie Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure, können über klassische Amid-Kupplungsreaktionen mit verschiedenen Kupplungsreagenzien (s. Abb. 2-8) glycosyliert werden. So konnten KICK et. al. beispielsweise Galactosylamin unter basischen Bedingungen spezifisch mit dem Kupplungsreagenz HBTU<sup>2</sup> an Glutaminsäurereste eines über bakterielle Expression hergestellten Peptids anbinden.<sup>[85]</sup> Darüber hinaus gibt es einige weiterer Ansätze, die HBTU als Kupplungsreagenz für Aminosäuren einsetzen.<sup>[86, 87]</sup> Der Nachteil bei der Verwendung von HBTU ist jedoch das basische Reaktionsbedingungen erforderlich sind und es somit nicht für 2-Aminozucker geeignet ist. Neben HBTU gibt es verschiedene Ansätze, die Carbodiimide, wie EDC, als Kupplungsreagenzien für die Glycosylierung einsetzen.<sup>[84, 88]</sup> Anders als HBTU erfordert EDC saure Reaktionsbedingungen, die für 1-Aminozucker ungeeignet sind, da diese im sauren pH-Bereich instabil sind. Eine pH-Wert unabhängige Möglichkeit zur Glycosylierung von Poly-L-glutaminsäure stellen einige Kupplungsreagenzien auf der Basis von Benzotriazol, wie BOP<sup>3</sup> und HOBt<sup>4</sup>, dar.<sup>[86, 89]</sup> So konnten KOBAYASHI et. al. mit einer Mischung aus BOP und HOBt verschiedene, überwiegend auf Lactose und N-Acetylglucosamin

<sup>2</sup> HBTU: *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium Hexafluorophosphat

<sup>3</sup> BOP: Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)phosphonium Hexafluorophosphat

<sup>4</sup> HOBt: Hydroxybenzotriazol

basierende Zucker an Polyglutaminsäure anbinden und erhielten Glycosylierungsgrade, die je nach Lösungsmittel und Kupplungsreagenzanteil zwischen 8-78 % lagen.<sup>[89–91]</sup> Ein immenser Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass bei der Reaktion mit BOP das stark karzinogene Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPA) entsteht. In Inhalationsversuchen mit Ratten wurden bereits bei Konzentrationen von < 0.05 ppm HMPA ein stark gehäuftes Auftreten von bösartigen Nasenhöhliertumoren beobachtet, weshalb HMPA in die Gruppe der sehr stark gefährdenden, krebserzeugenden Arbeitsstoffe eingestuft wurde und nur in geschlossenen Anlagen hergestellt und verwendet werden darf.<sup>5</sup> In neueren Publikationen wird daher als Alternative zunehmend DMT-MM<sup>6</sup> als pH-unabhängiges Amid-Kupplungsreagenz in wässrigen Lösungen verwendet.<sup>[22, 92–94]</sup> So konnte DMT-MM von MILDNER et. al. erfolgreich eingesetzt werden, um Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure mit unterschiedlichen Monosacchariden zu funktionalisieren. Die Menge an Zuckern am Polypeptidrückgrat konnte dabei über die Menge des eingesetzten Kupplungsreagenzes bis zu maximalen Substitutionsgraden von 80 % gesteuert werden.<sup>[92, 93]</sup>



**Abb. 2-8 Übersicht über verschiedene Amid-Kupplungs-Reagenzien für die Glycosylierung von PGA**

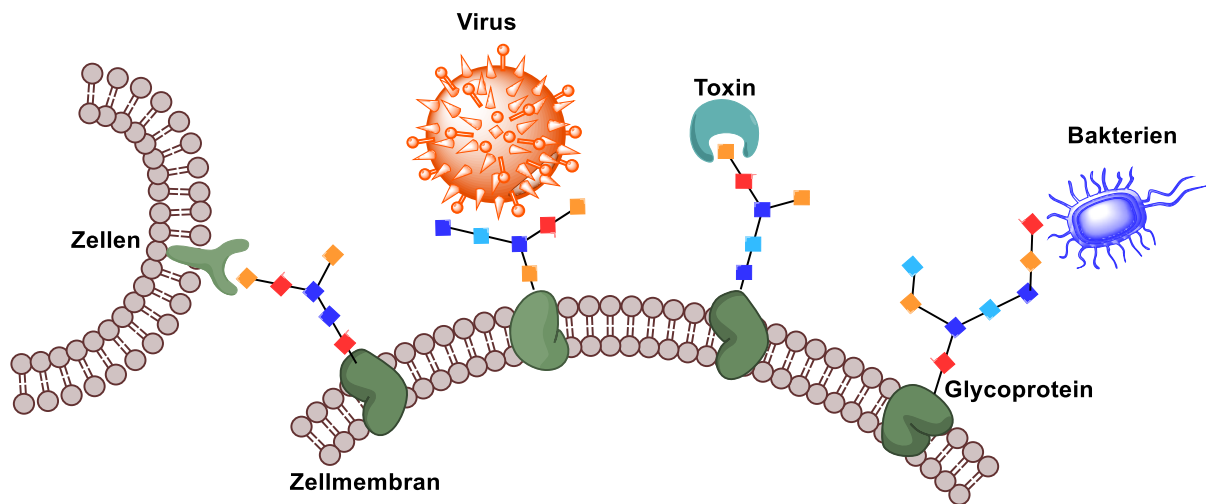
In ganz neuen Ansätzen wird versucht sequenzkontrollierte Glycopolyptide herzustellen, in denen die Position des Zuckerrestes und der Abstand zwischen den Zuckerresten genau definiert sind. Die Syntheserouten hierfür sind jedoch deutlich aufwendiger, als die zwei im vorherigen Abschnitt beschriebenen und bisher überwiegend verwendeten Syntheserouten. Eine Möglichkeit sequenzkontrollierte Glycopolyptide herzustellen basiert beispielsweise auf einer Kombination aus Festphasen-Peptid-Synthese (SPPS) und Stufenwachstumspolymerisation durch photoinduzierte Thiol-En Click Reaktion.<sup>[95]</sup> Darüber hinaus gibt es auch

<sup>5</sup> Bundesamt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin: Gefahrstoffverordnung GefStoffV und Technische Regeln für Gefahrstoffe (TRGS 905)

<sup>6</sup> DMT-MM: 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinchlorid

bereits Ansätze für die blocksequenzkontrollierte Synthese von Polypeptiden basierend auf sequenzieller Zugabe zweier unterschiedlicher NCAs. Hierbei konnten alternierend Blocklängen von 5-20 Wiederholungseinheiten mit gesamt Polymerisationsgraden von 40 Wiederholungseinheiten hergestellt werden.<sup>[94]</sup> Dieser Ansatz könnte auch auf die Synthese von blocksequenzkontrollierten Glycopolypeptiden übertragen werden.

### 3 Lektine und ihre Wechselwirkungen mit Glycoproteinen



**Abb. 3-1 Schematische Darstellung verschiedener Beispiele für Glycoprotein-Lektin Wechselwirkungen**

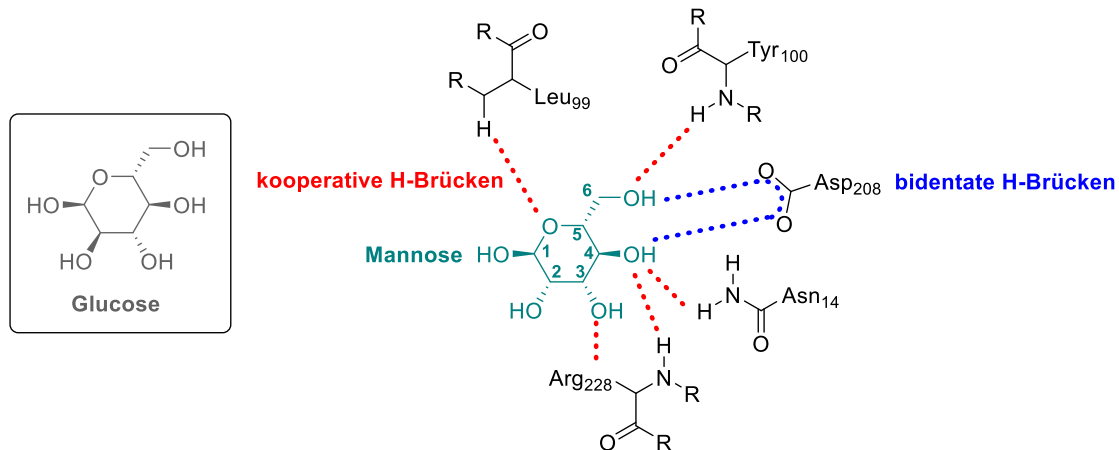
Lektine sind spezielle Proteine, die in der Lage sind Kohlenhydrate spezifisch und reversibel zu binden. Sie besitzen dabei anders als Enzyme keine katalytische Aktivität und sind auch keine Produkte einer Immunabwehrreaktion, wie beispielsweise Antikörper. Sie kommen in fast allen Organismen vor (Pflanzen, Bakterien, Tiere,..) und sind vor allem an verschiedenen Signal- und Erkennungsprozessen beteiligt, wie beispielsweise Zell-Zell-Wechselwirkungen, Infektionsprozesse mit Viren- und Bakterien sowie der Bindung von Toxinen (s. Abb. 3-1).<sup>[96]</sup>

Die meisten Lektine sind di- oder polyvalent und verfügen daher über mindestens zwei Kohlenhydratbindungsstellen (Carbohydrate Recognition Domain - CRD). Diese Bindungsstellen sind von ihrer Geometrie so aufgebaut, dass sie sehr spezifisch bestimmte Zucker binden können und hierbei zwischen strukturell sehr ähnlichen Zuckerderivaten oder Isomeren unterscheiden können. Beispielsweise kann das Lektin Concanavalin A spezifisch endständige  $\alpha$ -D-Mannose- und  $\alpha$ -D-Glucose-Reste erkennen.  $\alpha$ -D-Galactose, die sich von  $\alpha$ -D-Glucose lediglich durch die Stellung einer OH-Gruppe unterscheidet, wird von dem Lektin nicht gebunden. Die Selektivität geht häufig sogar soweit, dass auch zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Konfiguration der Zucker unterschieden werden kann. Im Falle des Beispiels Concanavalin A können  $\alpha$ -verknüpfte Glucose-Reste, wie Maltobiose, gebunden werden, während mit  $\beta$ -verknüpften Glucose-Resten, wie Cellobiose, keine Interaktion beobachtet werden kann.<sup>[97]</sup> Trotz der sehr hohen Selektivität bezüglich der Zucker sind die Affinitäten der Lektine gegenüber Monosacchariden meist schwach ( $K_a \approx 10^3 \text{ M}^{-1}$ ). Oligosaccharide zeigen häufig bis zu 1000-fach stärker-

re Wechselwirkungen mit den Lektinen ( $K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[96]</sup> Da Glycoproteine in der Regel größere Zuckerreste tragen (vgl. Kapitel 2.1), ist bei den in Abb. 3-1 gezeigten biologischen Erkennungsprozessen vor allem die Interaktion mit Oligosacchariden relevant. Für Wechselwirkungen mit Lektinen ist in erster Linie die Topographie der Zucker entscheidend. Oligosaccharide können in ihrer chemischen Struktur unterschiedlich sein und dennoch topographische Ähnlichkeiten aufweisen, die zu Interaktionen mit demselben Lektin führen. Umgekehrt können verschiedene Lektine denselben Zucker an unterschiedlichen Bereichen erkennen.<sup>[98]</sup>

Die wichtigsten Wechselwirkungen, die die Zucker-Lektin-Interaktion steuern, sind Wasserstoffbrückenbindungen. Wasserstoffbrückenbindungen sind stark genug, um eine Stabilität in der Liganden-Bindung zu erzeugen. Gleichzeitig sind sie aber auch schwach genug, um eine Dissoziation des Liganden zu erlauben, was eine dynamische Wechselwirkung ermöglicht. Darüber hinaus sind Wasserstoffbrückenbindungen anders als van-der-Waals-Kräfte gerichtete nicht-kovalente Wechselwirkungen, wodurch sich vor allem die Spezifität der Glycoprotein-Lektin-Interaktion erklären lässt.<sup>[99]</sup> Außerdem sind Kohlenhydrate prädestiniert dazu Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, da sie über eine Vielzahl exponierter Hydroxylgruppen verfügen. Diese Hydroxylgruppen können mit funktionellen Gruppen in den Seitenketten (z.B. Amid-, Carboxylat-, Ammonium-, Imidazol-, ... -Gruppen aus den Aminosäuren) oder seltener mit dem Peptidrückgrat des Lektins Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.<sup>[99]</sup> Am häufigsten werden einfache kooperative Wasserstoffbrückenbindungen der Struktur  $\text{NH}\cdots\text{OH}\cdots\text{O}=\text{C}$  beobachtet. Zusätzlich können aber auch bidentate Wasserstoffbrückenbindungen zweier benachbarter Hydroxylgruppen mit demselben planaren, polaren Seitenkettenrest (z.B. Asparagin(säure), Glutamin(säure), Arginin) auftreten (vgl. Abb. 3-2).<sup>[100]</sup> Insgesamt bildet sich so ein Netzwerk aus verschiedenen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Lektin, dem Zucker und eingeschlossenen Wassermolekülen aus. Zusätzlich können hydrophobe Wechselwirkungen unpolarer Bereiche die Wechselwirkungen verstärken. Hierzu gehören van-der-Waals Kräfte aber auch Wechselwirkungen mit aromatischen Aminosäureresten. Obwohl die Hydroxylgruppen der Zucker sehr polar sind, entstehen je nach Orientierung im Zuckerring hydrophobe Bereiche. Glucose besitzt beispielsweise hydrophobe Bereiche auf der  $\beta$ -Seite zwischen C3, C5 und C6 sowie eine kleinere hydrophobe Fläche auf der  $\alpha$ -Seite zwischen C2 und C4.<sup>[99, 101]</sup> Diese Bereiche können sowohl hydrophobe Wechselwirkungen als auch  $\text{CH}\cdots\pi$ -Wechselwirkungen mit aromatischen, unpola-

ren Aminosäuren wie Tryptophan und Phenylalanin eingehen. Diese CH- $\pi$ -Wechselwirkungen können durch partiell positive Ladungen am Zucker, die durch induktive Effekte benachbarter O- und OH-Gruppen beruhen, zusätzlich verstärkt werden.



**Abb. 3-2 Struktur der  $\alpha$ -D-Mannose-Bindungsstelle von Concanavalin A –  $\alpha$ -D-Glucose unterscheidet sich nur in der Orientierung der OH-Gruppe an C2 von  $\alpha$ -D-Mannose & kann daher ähnliche H-Brücken ausbilden<sup>[100]</sup>**

Werden die Zucker auf einem multivalenten Rückgrat präsentiert, wie es für natürliche Glycoproteine aber auch für eine Vielzahl synthetischer Verbindungen wie beispielsweise Glycopolypeptide und Glycodendrimere der Fall ist, werden besonders hohe Affinitäten zu den entsprechenden Lektinen beobachtet. Diese Affinitätserhöhung multivalenter Liganden ist häufig größer als es der Summe an Glycosylresten entspricht und wird als Glycosid-Cluster-Effekt bezeichnet.<sup>[2, 102, 103]</sup> Der genaue Mechanismus dieses Effekts ist noch nicht vollständig aufgeklärt.<sup>[104]</sup> Es wird aber angenommen, dass durch die Vielzahl an Zucker-Bausteinen verschiedene Mechanismen, wie Rezeptor-Clustering und die Chelatisierung mehrerer Bindungsstellen, sowie eine statistische Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für erneutes Binden des Liganden, dafür verantwortlich sind.<sup>[102, 104]</sup>



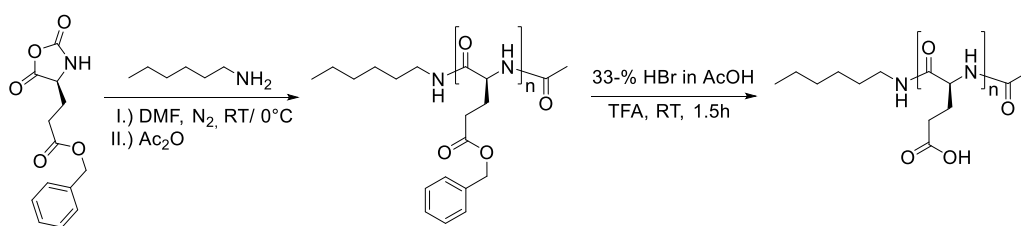
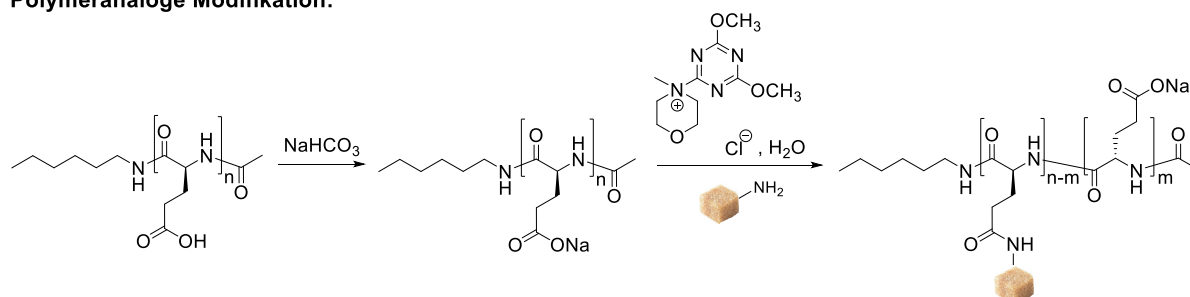
## 4 Synthese

Im folgenden Kapitel wird die gewählte Synthesestrategie zur Herstellung von Glycopolypeptiden vorgestellt, sowie die Ergebnisse der Synthesen und Charakterisierungen der Glycopolypeptide und entsprechender Vorstufen beschrieben.

### 4.1 Synthesestrategie

Wie bereits in Kapitel 2.3.3 erläutert, gibt es für die Synthese von Glycopolypeptiden zwei verschiedene Syntheseansätze: Die Polymerisation von glycosylierten NCAs und die polymeranaloge Modifizierung von Polypeptiden. Die Verwendung von glycosylierten NCAs ist synthetisch deutlich aufwendiger, weshalb für diese Arbeit die polymeranaloge Modifizierung gewählt wurde. Der polymeranaloge Ansatz ermöglicht eine Modifizierung der Polypeptide nach einer Art „Baukastenprinzip“. Es können flexibel verschiedene Zuckerreste angebunden und unterschiedliche Glycosylierungsgrade eingestellt werden. Als Ausgangspunkt wurde Polyglutaminsäure (PGA) gewählt. PGA verfügt über funktionalisierbare Carbonsäuregruppen in den Seitenketten des Polypeptids, die mit ungeschützten Aminosukcern umgesetzt werden können. Darüber hinaus ist sowohl die Synthese als auch das pH-responsive Verhalten von Polyglutaminsäure ausgiebig erforscht.<sup>[47, 105–109]</sup>

Betrachtet man die Zucker so sind Aminosucker eine synthetisch gut zugängliche Klasse funktionalisierter Zucker. Freie Aminosucker kommen aufgrund ihrer hohen Basizität natürlich zwar nicht vor, Aminogruppen treten jedoch in vielen natürlichen Polysacchariden auf (bspw. in Glycosaminoglycanen). Diese können als Basis für die Synthese von Aminosukcern dienen. So konnte bereits 1876 das D-Glucosamin Hydrochlorid von G. LEDDERHOSE aus Hummerschalen isoliert werden.<sup>[110]</sup> Außerdem können reduzierende Zucker synthetisch relativ einfach über eine KOCHETKOV-Aminierung in 1-Aminosucker überführt werden<sup>[111]</sup>, sodass heutzutage eine Vielzahl von 1- und 2-Aminosukcern kommerziell erhältlich sind. Die Aminosucker können dann über eine wässrige Amid-Kupplungsreaktion an das PGA-Rückgrat hydrolysestabil angebunden werden.<sup>[92]</sup> Eine Übersicht über den gewählten Syntheseansatz findet sich in Abb. 4-1.

**Polypeptid-Synthese:****Polymeranaloge Modifikation:****Abb. 4-1 Synthesestrategie für die Herstellung von Glycopolypeptiden****4.2 Synthese des Polypeptidrückgrats**

Die Synthese des Polypeptidrückgrats erfolgt wie in Abb. 4-1 gezeigt in zwei Stufen. In einem ersten Schritt wird ausgehend vom  $\gamma$ -Benzyl-L-glutamat-N-Carboxyanhydrid (BLG-NCA) über amin-initiierte ringöffnende Polymerisation Poly-Benzyl-L-glutamat (PBLG) hergestellt. Das PBLG wird anschließend in einem zweiten Reaktionsschritt durch saure Hydrolyse in Poly-L-glutaminsäure (PGA) überführt. Zum Schluss wird die PGA in ihr wasserlösliches Natriumsalz (PGA-Na) umgewandelt und steht dann für Amidkupplungsreaktionen mit Aminosukzern zur Verfügung. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Reaktionsschritte und der Ergebnisse findet sich in den folgenden Abschnitten (s. Kapitel 4.2.1 und 4.2.2).

**4.2.1 Poly-Benzyl-L-glutamat (PBLG)**

Die Synthese der Polyglutaminsäure erfolgte nach HABRAKEN et al. über eine amin-initiierte ringöffnende Polymerisation des NCA-Monomers  $\gamma$ -Benzyl-L-glutamat-N-carboxyanhydrid (BLG-NCA) mit Hexylamin bei 0°C.<sup>[51]</sup> Wie bereits in Kapitel 2.3.1 erläutert, werden bei der amin-initiierten Polymerisation kurzkettige Polypeptide erhalten ( $DP \leq 100$ ).<sup>[60]</sup> Bei der Polymerisation entsteht daher kurzkettiges Poly-Benzyl-L-glutamat (PBLG), das in einer anschließenden sauren Entschützungsreaktion mit HBr-Lösung in Polyglutaminsäure umgewandelt werden kann. Es wurde kommerziell erhältliches BLG-NCA der Firma Isochem verwendet.

Dieses besitzt laut Hersteller eine Reinheit von 98 % und wurde ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde BLG-NCA der Firma IRIS Biotech verwendet, für das ebenfalls eine Reinheit von 98 % angegeben wird. Das in der Polymerisation entstandene PBLG wurde mittels  $^1\text{H}$ -NMR- und FTIR-Spektroskopie charakterisiert (s. Anhang 1 und Anhang 20). Der Polymerisationsgrad wurde über die Signalintensität der Endgruppe (Initiator) im Verhältnis zur Signalintensität der Methingruppe des Peptidrückgrats aus dem  $^1\text{H}$ -NMR bestimmt (vgl. Anhang 1). Die Molekulargewichtsverteilung und Dispersität  $\bar{D}$  wurden durch GPC-Messungen in DMF (+LiBr) durch Dreifachbestimmung erhalten. Aus dem Zahlenmittel  $M_n$  der Molekulargewichtsverteilung und der Masse einer Wiederholungseinheit des PBLGs lässt sich der Polymerisationsgrad berechnen und mit dem aus dem  $^1\text{H}$ -NMR erhaltenen Polymerisationsgrad vergleichen. Tabelle 4-1 zeigt eine Übersicht über die hergestellten Polypeptide.

**Tabelle 4-1 Ergebnisse der amin-initiierten Polymerisation von  $\gamma$ -Benzyl-L-glutamat-N-Carboxyanhydrid**  
(\*Isochem, #IRIS Biotech, n.b. – nicht bestimmt)

PBLG	M/I	Umsatz	$P_n$ (theor.)	$M_n$ [g/mol]	$\bar{D}$	$P_n$ (GPC)	$P_n$ ( $^1\text{H}$ -NMR)
PBLG 1*	60	95 %	57	$13,700 \pm 200$	1.01	62	n. b.
PBLG 2*	60	95 %	57	$13,200 \pm 800$	1.04	60	n. b.
PBLG 3*	60	89 %	53	$12,300 \pm 200$	1.01	56	n. b.
PBLG 4*	60	88 %	53	n.b.	n.b.	n.b.	50
PBLG 5*	62.5	89 %	56	$10,400 \pm 300$	1.02	48	47
PBLG 6#	64	96 %	61	$11,200 \pm 200$	1.02	51	48
PBLG 7#	138	92 %	127	$15,400 \pm 400$	1.07	70	76
PBLG 8#	140	95 %	133	$16,200 \pm 300$	1.10	74	99

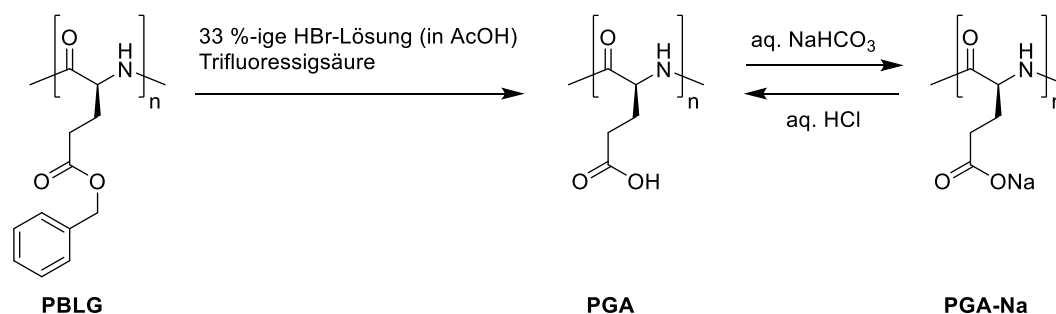
Alle hergestellten PBLGs weisen eine niedrige Dispersität  $\bar{D}$  auf. Sie besitzen also eine sehr enge Molekulargewichtsverteilung, was für eine kontrollierte Polymerisation spricht. Darüber hinaus zeigt sich, dass der Polymerisationsgrad weitgehend über das Monomer/Initiator-Verhältnis einstellbar ist. Für die Polymere, die aus dem BLG-NCA der Firma IRIS Biotech hergestellt wurden, zeigen sich etwas größere Abweichungen ( $\approx 15\%$ ) vom the-

oretisch möglichen Polymerisationsgrad ( $M/I \cdot \text{Umsatz}$ ) als für PBLGs aus dem Isochem NCA ( $\approx 5\%$ ). Obwohl für beide NCAs eine Reinheit von 98 % angegeben wurde, unterschieden sie sich optisch und in Konsistenz, sodass das IRIS Biotech NCA möglicherweise über mehr störende Verunreinigungen verfügt als das NCA von Isochem. Vergleicht man die Polymerisationsgrade, die über GPC bestimmt wurden mit denen, die aus dem  $^1\text{H-NMR}$  erhalten wurden, so treten nur geringe Abweichungen zwischen den Werten auf. Die stärksten Abweichungen wurden beim Versuch höhere Polymerisationsgrade ( $\approx 140$ ) einzustellen erhalten. Die gemessenen Polymerisationsgrade lagen mit nur etwa 70 Wiederholungseinheiten deutlich unterhalb der eingestellten Monomer/Initiator-Verhältnisse und die Abweichung zwischen dem aus GPC und  $^1\text{H-NMR}$  bestimmten Polymerisationsgrad war deutlich größer als bei den kurzkettigeren Polypeptiden. Diese Unterschiede spiegeln sich auch in der gestiegenen Dispersität der Proben wieder, was für eine weniger kontrollierte Reaktion spricht. Für Polymerisationsgrade  $> 70$  sollte daher zukünftig Übergangsmetallkatalysierte Polymerisationen in Betracht gezogen werden.

#### 4.2.2 Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure (PGA)

Aus dem PBLG lässt sich durch Abspaltung der Benzylgruppe Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure herstellen. Die Abspaltung erfolgte durch saure Hydrolyse mit Bromwasserstoff-Lösung unter wasserfreien Bedingungen (s. Abb. 4-2). Der Vorteil bei der Verwendung von Bromwasserstoff-Lösung zur Entfernung der Benzylester liegt in der vollständigen Entfernung der Schutzgruppen, während bei der Hydrolyse mit alkalischen, alkoholischen Lösungen bis zu 1/3 der Benzylester erhalten bleiben.<sup>[105, 112]</sup> Zusätzlich tritt bei der alkalischen Hydrolyse eine Racemisierung des Peptidrückgrates auf, wodurch die Ausbildung von Sekundärstrukturen beeinträchtigt wird.<sup>[105]</sup> Bei der Debenzylierung mit Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure wird hingegen die Konformation des Peptidrückgrats erhalten, sodass die Ausbildung helikaler Strukturen möglich ist. Ein Nachteil der sauren Hydrolyse ist allerdings, dass es zu Ketten-spaltungen und somit zu einem Abbau des Molekulargewichts kommt. IDELSON und BLOUT fanden durch Molekulargewichtsbestimmungen heraus, dass es unter optimalen wasserfreien Reaktionsbedingungen zu etwa einem Kettenbruch je 1000 abgespaltenen Benzylestern kommt.<sup>[113]</sup> Der Einfluss der Kettenspaltung auf die Molekulargewichtsverteilung ist somit vor allem für hochmolekulare Polypeptide von Bedeutung. Über amin-initiierte Polymerisation hergestellte Homopolypeptide haben von vornherein niedrige Polymerisationsgrade und somit auch niedrige Molekulargewichte. Bei den in dieser Arbeit verwendeten

Polymerisationsgraden von 50-100 Wiederholungseinheiten beträfe ein Kettenbruch pro 1000 Einheiten im Durchschnitt nur jede 10-20-ste Peptidkette, sodass der Einfluss auf die gesamte Molekulargewichtsverteilung vernachlässigbar ist. Für diese Arbeit wurde daher die Debenzylierung mit Bromwasserstoff-Lösung nach einer Vorschrift von BABIN et al. gewählt.<sup>[114]</sup> Bei der sauren Hydrolyse entsteht die protonierte Form der Poly-L-glutaminsäure. Diese ist nicht wasserlöslich und muss daher für die anschließend geplante wässrige Amidkupplung mit DMT-MM (s. Synthesestrategie Abb. 4-1) in das wasserlösliche Natriumsalz überführt werden. Hier kann es, ähnlich wie bei der alkalischen Debenzylierung, zu einer Racemisierung des Polypeptides kommen, wenn starke Basen wie Natriumhydroxid verwendet werden. Als mildes Deprotonierungsmittel, bei dem keine Racemisierung auftritt, kann Natriumhydrogencarbonat-Lösung verwendet werden.<sup>[92]</sup> Nach anschließender Dialyse und Lyophilisation wird dann das wasserlösliche Poly-L-glutaminsäure Natriumsalz (PGA-Na) erhalten, dass durch Ansäuern mit HCl-Lösung auch wieder in seine unlösliche protonierte Form überführt werden kann (Abb. 4-2).



**Abb. 4-2 Saure Hydrolyse von PBLG zur Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure und Deprotonierung zum Natriumsalz**

Anhand der NMR-Daten der PGA-Na's (Anhang 2) ist zu erkennen, dass die Debenzylierung vollständig abgelaufen ist. Die Signale der Protonen vom Benzylring, die beim PBLG bei ca. 7.2 ppm aufgetreten sind, fehlen im NMR der PGA-Na. Ebenso sind keine Signale der Methylengruppe des Benzylesters (ca. 5.1 ppm) im NMR der PGA-Na zu finden. Mittels GPC-Messungen der PGA-Na's in Phosphatpuffer (pH 7.4) wurden die Molekulargewichtsverteilungen und Dispersitäten der Proben erhalten (Tabelle 4-2). Wie erwartet nimmt durch Abspaltung der Benzylester das Molekulargewicht der Proben ab. Vergleicht man die Polymerisationsgrade der erhaltenen PGA-Na-Salze mit den Polymerisationsgraden der PBLGs, so ist kein signifikanter Kettenabbau durch saure Hydrolyse zu beobachten (Tabelle 4-2). Die Polymerisationsgrade vor und nach der Debenzylierung sind vergleichbar. Wie bereits erwähnt,

fällt der Einfluss von Kettenbrüchen bei niedrigen Polymerisationsgraden nicht so stark ins Gewicht, wie bei hohen Polymerisationsgraden. Sollte es zu Kettenbrüchen gekommen sein, sind kleine Fragmente der Polyglutaminsäure sehr wahrscheinlich bei der Aufreinigung durch Dialyse entfernt worden (Cut-Off: 3500 g/mol), sodass der Einfluss auf das Molekulargewicht entfällt, da nur die größeren Ketten im Dialyseschlauch verweilen können. Hierfür sprechen auch die nach wie vor niedrigen Dispersitäten der Proben. Würden sich noch kleine Fragmente der Polyglutaminsäure im Lyophilisat befinden, würden größere Dispersitäten erwartet werden.

**Tabelle 4-2 Ergebnisse der Debenzylierung und Deprotonierung zur PGA-Na, \*über GPC bestimmt**

PGA-Na	M <sub>n</sub> [g/mol]	Đ	P <sub>n</sub> (GPC)	P <sub>n</sub> ( <sup>1</sup> H-NMR)	P <sub>n</sub> (PBLG)*
PGA 1	7,900 ± 400	1.03	62	63	62
PGA 2	7,800 ± 300	1.06	61	58	60
PGA 3	n.b	n.b	n.b	52	56
PGA 4	6,800 ± 400	1.14	53	54	n.b
PGA 5	8,700 ± 300	1.01	68	56	48
PGA 6	6,800 ± 50	1.00	53	56	51
PGA 7	12,800 ± 100	1.09	100	128	70
PGA 8	9,600 ± 500	1.04	74	143	74

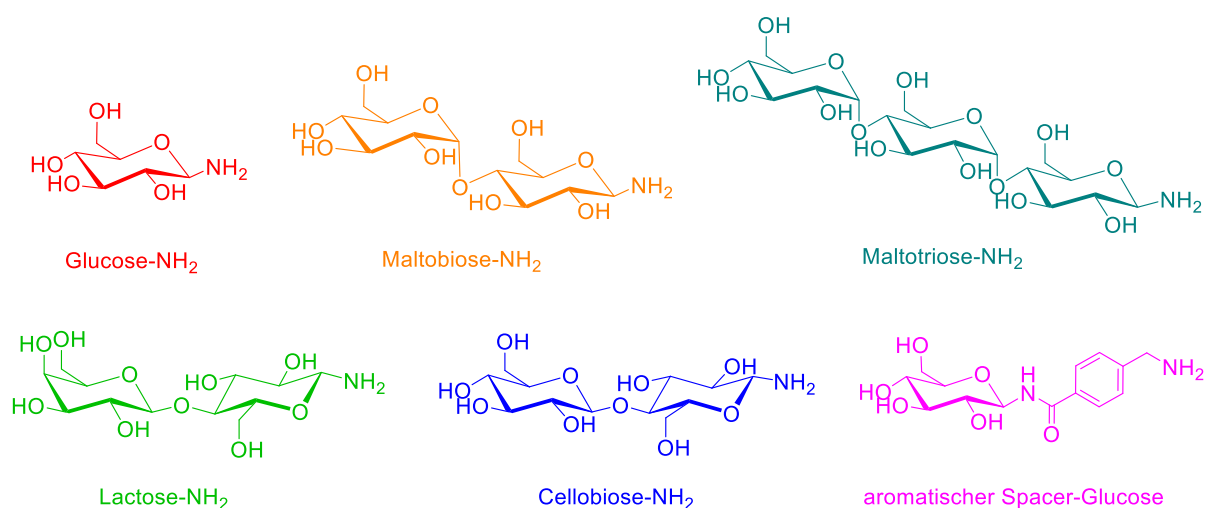
Um zu überprüfen, ob es bei der sauren Hydrolyse oder der Deprotonierung der Poly-L-glutaminsäure zu einer Racemisierung des Polypeptidrückgrats gekommen ist, wurden CD-Spektroskopie-Untersuchungen durchgeführt. Wenn keine Racemisierung stattgefunden hat, sollte die Polyglutaminsäure im sauren pH-Bereich in der Lage sein helikale Strukturen auszubilden.<sup>[109]</sup> Alle hergestellten Polyglutaminsäuren sind in der Lage, in Abhängigkeit ihrer Kettenlänge eine Helix auszubilden. Eine detaillierte Betrachtung der Sekundärstrukturen der hergestellten Polypeptide findet sich in Kapitel 5.

### 4.3 Synthese der Aminosucker

Zucker, bei denen eine oder mehrere Hydroxylgruppen (-OH) durch Aminfunktionen (-NH<sub>2</sub>) ersetzt sind, werden als Aminosucker bezeichnet. Am verbreitetsten sind hierbei Aminosucker, die die Aminfunktion am anomeren Zentrum (C1-Position) oder benachbart in C2-Position tragen. Zucker, die die Aminfunktion in C1-Position tragen werden auch als 1-amino-1-deoxy-Zucker oder Glycosylamine bezeichnet. Befindet sich die Aminfunktion in C2-Position handelt es sich um 2-amino-2-deoxy-Zucker bzw. Glycosamine. Im Hinblick auf die gewünschten Interaktionen der Glycopolypeptide mit Lektinen spielen Aminosucker mit der Aminfunktion in anderen Positionen als C1 und C2 eine untergeordnete Rolle. Für die Zucker-Lektin-Wechselwirkungen sind vor allem Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen der Zucker und dem Lektin verantwortlich. In viele dieser Interaktionen sind die Hydroxylgruppen in C3- und C4-Position involviert. So konnten LEE und LEE zeigen, dass bei C-Type Lektinen, wie dem „mannose-binding protein“ (MBP), große Substituenten an C1- und C6-Position die Interaktion der Zucker mit dem MBP nicht beeinflussen, während Substituenten an C3- und C4-Position eine Interaktion behindern.<sup>[2]</sup> Ähnliches wurde auch für andere Lektine wie das WBA (winged bean agglutinin) bestätigt. Werden die OH-Gruppen des Bindungspartners Galactose in C3- und C4-Position durch Fluor ersetzt, wird die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum WBA verhindert.<sup>[115]</sup> Als Modell-Lektin dient in dieser Arbeit ebenfalls ein C-Typ Lektin - das Concanavalin A (ConA). Dementsprechend wurden keine in C3- und C4-Position modifizierten Zucker verwendet.

Beim Concanavalin A handelt es sich um ein pflanzliches Lektin aus der Jackbohne (*canavalia ensiformis*), das spezifisch  $\alpha$ -D-Mannose und  $\alpha$ -D-Glucose Einheiten binden kann.<sup>[96]</sup> Für diese Arbeit wurden daher auf Glucose-basierende 1-amino-1-deoxy-Zucker ausgewählt. Ziel ist es, zu untersuchen, ob es Beziehungen zwischen der Struktur der verwendeten Zucker und der Wechselwirkung mit dem Concanavalin A gibt. Hierfür wurde die Größe des Zuckerrestes variiert, sowie der Abstand der Glucose vom Polypeptidrückgrat über einen Spacer vergrößert. Für nicht multivalente Liganden können Affinitätszunahmen vom Monosaccharid hin zu Oligosacchariden beobachtet werden. Die größten Affinitäten werden hingegen für multivalente Liganden aufgrund des Glycosid-Cluster-Effekts erhalten. Die meisten in der Literatur beschriebenen Glycopolypeptide sind indes mit Monosacchariden funktionalisiert.<sup>[3, 116]</sup> Umfassende Untersuchungen, ob es bei einer Funktionalisierung der Polypeptide mit Di- oder

Trisacchariden zu einer weiteren Steigerung der Affinität kommt, gibt es bisher nicht. Es gibt jedoch Hinweise, dass ein größerer Abstand der Zuckerreste vom Polypeptidrückgrat die Interaktion mit Lektinen verbessern kann.<sup>[31, 93]</sup> Die Abstandsvergrößerung erhält man bei der Verwendung von Di- und Trisacchariden für die endständige Glucoseeinheit automatisch durch die vorherigen Zuckereinheiten. Zusätzlich wurde noch ein hydrophober Spacer hergestellt, der endständig Glucose trägt. Als Referenzsubstanzen wurden Cellobiosylamin ( $\beta$ -1,4-verknüpfte Glucose) und Lactosylamin ( $\beta$ -1,4-verknüpft Glucose-Galactose) ausgewählt, da beide nicht in der Lage sind Concanavalin A zu binden. Eine Übersicht über die verwendeten Zucker findet sich in Abb. 4-3.



**Abb. 4-3** Verwendete 1-amino-1-deoxy-Zucker: Glucosylamin (rot), Maltobiosylamin (orange), Maltotriosylamin (türkis), Lactosylamin (grün), Cellobiosylamin (blau) und aromatischer Spacer-Glucose (pink)

Die Synthese der in Abb. 4-3 gezeigten Zucker erfolgte mittels KOCHETKOV-Aminierung nach einer modifizierten Literaturvorschrift.<sup>[117]</sup> Hierfür wurden die Zucker in einer gesättigten Ammoniumcarbonat-Lösung gerührt, wodurch die Hydroxylgruppe am anomeren Kohlenstoff in eine Aminogruppe überführt wird. Mechanistisch begründet entsteht ausschließlich die  $\beta$ -Konfiguration des Aminosuckers (vgl. Anhang 47). Eine Mutarotation in die  $\alpha$ -Konfiguration ist nicht möglich. Die entsprechenden Rohprodukte wurden mittels  $^1\text{H}$ -NMR charakterisiert (s. Anhang 3 - Anhang 7). Neben den Signalen der 1-amino-1-deoxy-Zucker treten im NMR Signale auf, die den jeweiligen Edukten sowie einem in einer Nebenreaktion entstehenden Dimer zugeordnet werden können (vgl. Abb. 4-6, oben). Eine chromatographische Auftrennung der Produkte in wässrigem Medium ist nicht möglich.<sup>[118]</sup> Da jedoch weder die als Edukte eingesetzten Zucker noch das in einer Nebenreaktion entstehende Dimer an der späteren Amid-Kupplungsreaktion mit dem Polypeptid teilnehmen können, kann auf



eine Aufreinigung des Rohproduktes verzichtet werden. Die jeweiligen Anteile an Edukt, Dimer und 1-amino-1-deoxy-Zucker lassen sich auf Grund ihrer unterschiedlichen Verschiebung aus dem  $^1\text{H}$ -NMR über die Integralverhältnisse der Signale des anomeren Wasserstoffs bestimmen. Für die KOCHETKOV-Aminierung von D-Glucose ergeben sich beispielsweise folgende Verschiebungen:  $\beta$ -D-Glucosylamin – 4.12 ppm, Di- $\beta$ -D-Glucosylamin – 4.31 ppm,  $\alpha$ -D-Glucose – 4.67 ppm,  $\beta$ -D-Glucose – 5.25 ppm. Eine Übersicht über die erhaltenen Produktzusammensetzungen bezogen auf die Stoffmenge findet sich in Tabelle 4-3. Für alle hergestellten Aminosucker liegt der Produktanteil im Gemisch etwa bei 80-90 %. Verglichen mit der verwendeten Literaturvorschrift konnte der Anteil an Dimer, dadurch reduziert werden, dass getrocknetes Methanol zum Entfernen überschüssigen Ammoniumcarbonats verwendet wurde, um den Wasseranteil in der Reaktion gering zu halten. Je trockener der Rückstand und das verwendete Methanol, desto geringere Bildung des Dimers wurde beobachtet.

**Tabelle 4-3 Rohproduktzusammensetzungen der KOCHETKOV-Aminierungen  
(bestimmt über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie)**

Edukt	Anteil im Produktgemisch [%]			
	Glucosylamin	Dimer	Edukt ( $\alpha$ )	Edukt ( $\beta$ )
<b>D-Glucose</b>	84.8	9.1	2.2	3.3
<b>D-Maltobiose</b>	82.0	6.0	4.0	8.0
<b>D-Maltotriose</b>	78.8	4.7	6.1	10.4
<b>D-Cellobiose</b>	82.1	9.5	3.2	5.2
<b>D-Lactose</b>	89.7	2.8	0.9	6.6

## 4.4 Anbindung der Aminosucker an das Polypeptidrückgrat

Die Anbindung der hergestellten Aminosucker erfolgt über eine Amidkupplungsreaktion. Üblicherweise wird hierbei zunächst die Carbonsäure durch das Kupplungsreagenz aktiviert und die aktive Spezies in einem zweiten Reaktionsschritt durch das Amin nukleophil angegriffen.<sup>[119]</sup> Wie bereits in Kapitel 2.3.3 ausgeführt, kommen hierfür theoretisch mehrere Kupplungsreagenzien in Frage. Für die Auswahl des Kupplungsreagenzes waren verschiedene Faktoren von Bedeutung: Das Kupplungsreagenz sollte für eine wässrige Amidkupplung geeignet sein, da sowohl die Zucker als auch die PGA-Na wasserlöslich sind. Darüber hinaus sollte die Aktivierung der Carbonsäure *in situ* erfolgen, um eine Isolierung und Aufreinigung der empfindlichen Zwischenstufe zu vermeiden. Außerdem sollte das Kupplungsreagenz möglichst universell einsetzbar sein (bspw. keine pH-Abhängigkeit), um die Methode auf verschiedene Zucker oder zukünftig auch andere Funktionalisierungen, die in Kombination mit Zuckern sinnvoll sind (bspw. funktionelle Gruppen zur Anbindung an Oberflächen oder Wirkstoffe) übertragen zu können. Aufgrund dieser Kriterien fielen gängige Amidkupplungsreagenzien wie EDC und HBTU (pH-Abhängigkeit) aus. Ein Kupplungsreagenz, das die Kriterien erfüllt und Amidkupplungen im neutralen pH-Bereich und die Aktivierung der Carbonsäure *in situ* ermöglicht, ist das 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinchlorid (DMT-MM).<sup>[120, 121]</sup> Dieses wurde bereits erfolgreich für die Anbindung von 1-Amino-1-deoxy- als auch 2-Amino-2-deoxy-Zuckern eingesetzt und wird daher auch in dieser Arbeit verwendet.<sup>[92, 93]</sup>

Die Kupplungsreaktion mit DMT-MM kann ohne weitere Zusätze direkt in Wasser durchgeführt werden, während beispielsweise bei Carbodiimiden wie dem EDC häufig noch Zusätze wie *N*-Hydroxysuccinimid nötig sind und strikt auf die Einhaltung des pH-Werts geachtet werden muss. Durch den Verzicht auf organische Lösemittel und Reaktionszusätze kann die anschließende Aufreinigung der Glycopolypeptide durch Dialyse erfolgen, was eine sehr leichte und schonende Methode darstellt. Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Auswahl des DMT-MM war die hohe Selektivität der Reaktion. Dies ist sehr wichtig, da die aktivierte Carbonsäure theoretisch auch mit Hydroxylgruppen, welche in hoher Zahl an den (ungeschützten) Zuckern vorhanden sind, einen Ester bilden kann. Würde dies passieren, könnte es anstatt einer kontrollierten Anbindung an das Polypeptidrückgrat zu einer Vernetzung der Aminosucker kommen. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Amidbildung muss daher deutlich

höher sein als die Esterbildung, zumal die Hydroxylgruppen in sehr viel höherer Zahl vorhanden sind als die Aminfunktionen. KUNISHIMA et al. konnten an mehreren Beispielen belegen, dass die Geschwindigkeit der Amidbildung für DMT-MM 20,000-fach schneller ist als die der Esterbildung. Bei der Kupplung mit DMT-MM wird daher zu  $\geq 96\%$  das Amid gebildet und der Ester entsteht nur in Spuren.<sup>[119]</sup> Andere Kupplungsreagenzien weisen deutlich schlechtere Selektivitäten auf. So wird beim EDC oder DCC auf jedes 3-4 gebildete Amid eine Esterbildung beobachtet.<sup>[119]</sup>

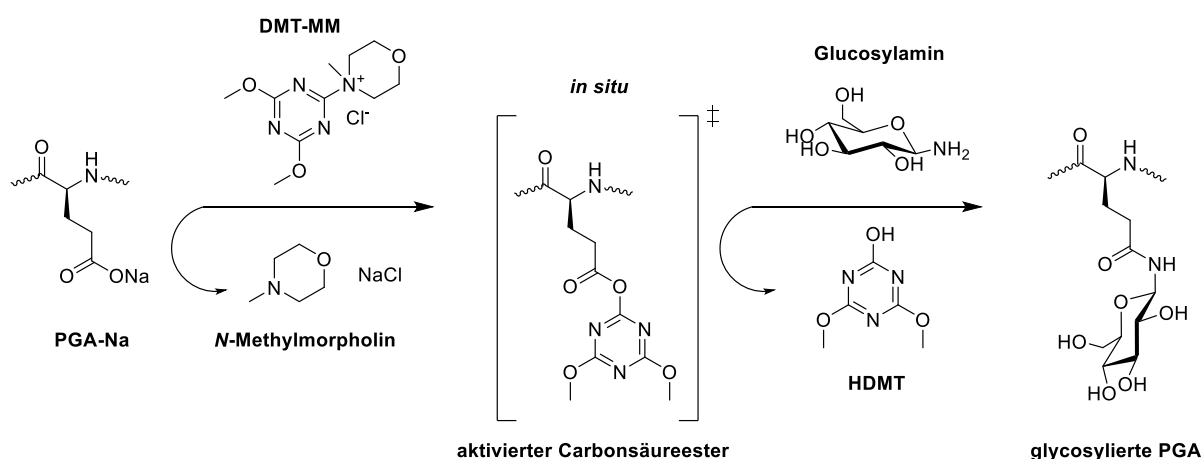


Abb. 4-4 Mechanismus der Glycosylierung von PGA-Na mit DMT-MM

Mechanistisch verläuft die Amidkupplung mit DMT-MM in zwei Schritten. Zunächst reagiert das DMT-MM mit dem Polyglutaminsäure-Natriumsalz und bildet einen aktivierten Carbonsäureester – das 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl-glutamat – (Abb. 4-4). Bei dieser Reaktion werden *N*-Methylmorpholin und Natriumchlorid freigesetzt. Der aktivierte Carbonsäureester reagiert dann in einem zweiten Reaktionsschritt mit den Aminosuckern unter Ausbildung der Amidbindung und Abspaltung von HDMT (2-Hydroxyl-4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin). Ein Vorteil dieser Reaktion liegt darin, dass auch Hydrochloride direkt eingesetzt werden können, da im ersten Reaktionsschritt die Base *N*-Methylmorpholin freigesetzt wird. Diese kann Hydrochloride in freie Amine überführen, indem sie selbst zum *N*-Methylmorpholin Hydrochlorid reagiert. Von Bedeutung ist das vor allem für instabile freie Amine, da diese dann aus dem Hydrochlorid *in situ* gebildet werden können.

#### 4.4.1 Anbindung von Glucosylamin

Beispielhaft soll die Anbindung der Aminozucker an PGA anhand von Glucosylamin besprochen werden (vgl. Abb. 4-4). Polyglutaminsäure Natriumsalz, Glucosylamin und DMT-MM wurden in Anlehnung an eine Vorschrift von R. MILDNER für 24 Stunden in einer wässrigen Lösung ohne weitere Zusätze, wie beispielsweise Puffer, gerührt.<sup>[92]</sup> Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Dialyse aufgereinigt und lyophilisiert. Hierbei wurden die Verhältnisse des Kupplungsreagenzes zu den PGA-Na Wiederholungseinheiten variiert, um unterschiedliche Glycosylierungsgrade zu erhalten. Der Aminozucker wurde jeweils im Überschuss zum Kupplungsreagenz eingesetzt, damit immer ausreichend Aminozucker für die Reaktion mit dem *in situ* gebildeten aktivierten Carbonsäureester zur Verfügung stehen. Es wurden fünf verschiedene Verhältnisse von Kupplungsreagenz zu PGA-Na Wiederholungseinheiten getestet und der Erfolg der Anbindung mit unterschiedlichen Glycosylierungsgraden mittels FTIR- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie charakterisiert.

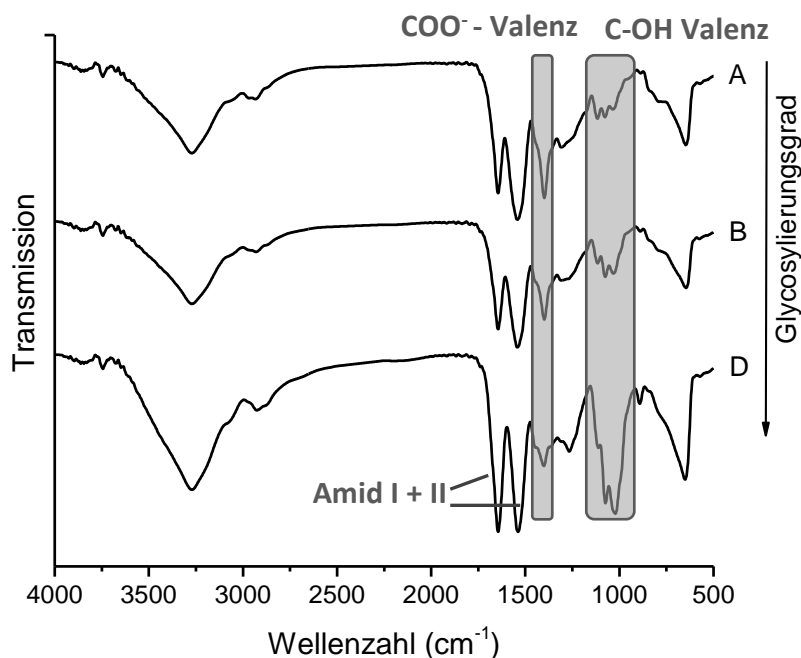


Abb. 4-5 FTIR-Spektren von PGA-Glucose mit DS 6 % (A), DS 19 % (B) und DS 62 % (D)

In den FTIR-Spektren der PGA-Glucose (Abb. 4-5) ist zu erkennen, dass mit steigendem Glycosylierungsgrad die Bande der symmetrischen Valenzschwingung der Carboxylat-Anionen (1398 cm⁻¹) abnimmt.<sup>[122]</sup> Da die Carboxylat-Gruppen bei Kupplungsreaktion in Amidgruppen überführt werden, wird dies für eine erfolgreiche Glycosylierung auch so erwartet. Zusätzlich kann eine Zunahme der Amid-I-Bande beobachtet werden. Da das Polypeptid jedoch von

vorneherein über eine Vielzahl von Amidbindungen im Rückgrat verfügt, ist diese Bande nur bedingt für die qualitative Bewertung des Reaktionserfolgs geeignet. Ein besserer Beleg für die erfolgte Glycosylierung liefert eine neue Bande bei ca.  $1070\text{ cm}^{-1}$ , die der C-O-Valenzschwingung der Hydroxylgruppen des Glucosylrests zugeordnet werden kann. Je mehr Kupplungsreagenz in der Reaktion eingesetzt wurde und umso mehr Aminozucker somit theoretisch an das Glycopolypeptid angebunden werden konnten, desto intensiver ist die Bande der C-O-Valenzschwingung. Dies deutet darauf hin, dass die Anbindung der Aminozucker mit unterschiedlichen Glycosylierungsgraden erfolgreich war. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch für die übrigen angebundenen Aminozucker (s. IR-Spektren, Anhang 24-Anhang 27).

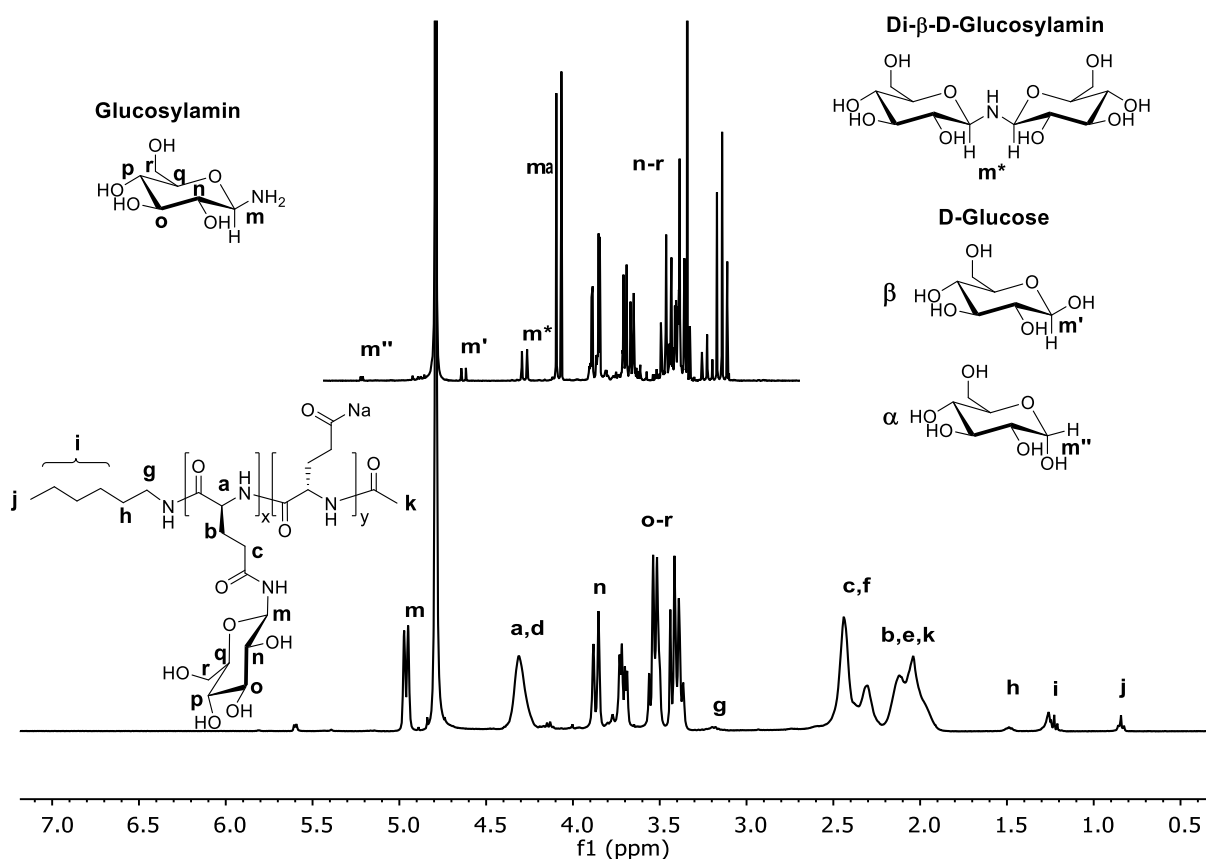


Abb. 4-6  $^1\text{H}$ -NMR Spektren von  $\beta$ -D-Glucosylamin (oben) und PGA-Glucose [DS 61.5, DP 62] (unten)

Eindeutigere Ergebnisse liefern die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren. Abb. 4-6 oben zeigt das Spektrum des eingesetzten Glucosylamins. Im unteren Spektrum ist Polyglutaminsäure nach der Amidkupplungsreaktion mit DMT-MM und Glucosylamin zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anbindung des  $\beta$ -D-Glucosylamins erfolgreich verlaufen ist, da sich die Signale der Gerüstprotonen (Signale n-r, 3.25-4 ppm) des Glucosylamins jetzt auch im Spektrum der Po-

lyglutaminsäure finden. Außerdem ist an der Verschiebung des Protons am anomeren Kohlenstoff des Glucosylamins (m, 4.96 ppm) zu erkennen, dass die  $\beta$ -Konfiguration bei der Anbindung an die PGA erhalten bleibt.<sup>[91]</sup> Zusätzlich lässt sich über das  $^1\text{H}$ -NMR aus dem Verhältnis des Signals der Methingruppe im Peptidrückgrat (a+d, 4.3 ppm) zu den Gerüstprotonen (3.25-4 ppm) oder dem anomeren C-Atom (m, 4.96 ppm) des Glucosylrestes der Glycosylierungsgrad bestimmen. Tabelle 4-4 zeigt die Ergebnisse der Kupplungsreaktion für fünf verschiedene PGA-Na zu DMT-MM-Verhältnisse.

**Tabelle 4-4 Ergebnisse der Kupplungsreaktion von PGA-Na (DP 62) mit Glucosylamin**  
\*berechnet über DS/eq.[DMT-MM]

PGA-Na [eq.]	Glu-NH <sub>2</sub> [eq.]	DMT-MM [eq.]	DS	Kupplungs- Effizienz*
1	0.2	0.1	0.06	60 %
1	0.5	0.25	0.19	76 %
1	1	0.5	0.36	72 %
1	2	1	0.62	62 %
1	2	2	0.80	40 %

Je mehr Stoffmengen-Äquivalente DMT-MM in der Kupplungsreaktion eingesetzt werden, desto mehr Glucosylamin kann angebunden werden und desto höher ist der resultierende Glycosylierungsgrad. Allerdings ist zu erkennen, dass mit steigender Menge Zucker am Peptidrückgrat die Kupplungseffizienz nachlässt. Der maximal erreichbare Glycosylierungsgrad lag bei doppeltem Überschuss an DMT-MM bei 80 %. Die Ursache hierfür ist sehr wahrscheinlich sterisch begründet. Umso mehr Glucosereste am Polypeptidrückgrat angebunden sind, desto schlechter zugänglich werden die noch nicht umgesetzten Carboxylatgruppen. Dies hat zur Folge, dass entweder die Aktivierung der Carboxylatgruppen durch das DMT-MM oder aber die anschließende Amidkupplung des Glucosylamins nicht ablaufen kann. Über DMT-MM können dementsprechend zwar keine vollständig glycosylierten Polypeptide hergestellt werden. Nichtsdestotrotz ist der Glycosylierungsgrad über einen sehr großen Bereich (ca. 0-80 %) mittels DMT-MM einstellbar.

#### 4.4.2 Anbindung von Di- und Trisacchariden

Analog zu der Anbindung von Glucosylamin wurde versucht verschiedene auf Glucose basierende Di- und Trisaccharide an Polyglutaminsäure anzubinden. Es wurden wiederum fünf verschiedene PGA:DMT-MM Verhältnisse getestet und der Glycosylierungsgrad und die Kupplungseffizienz über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie bestimmt. In Abb. 4-7 ist beispielhaft das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum für die Anbindung von Maltotriosylamin gezeigt. Wie beim Glucosylamin, können auch hier die Signale der Protonen vom Zucker nach der Amidkupplungsreaktion im Spektrum des Polypeptids gefunden werden. Neben den Gerüstprotonen (ca. 3.5-4.0 ppm, n-r), sind bei Di- und Trisacchariden zusätzlich die Signale der Protonen benachbart zu der 1,4-Verknüpfung der Zucker deutlich zu erkennen (ca. 5.5 ppm, z). So steht zur Bestimmung des Glycosylierungsgrades ein weiteres Signal (z) neben den Gerüstprotonen (n-r) und dem Proton am anomeren C-Atom (m) zur Verfügung. Dieses Signal ist außerdem wichtig, um zu prüfen, ob es sich tatsächlich um Di- bzw. Trisaccharide am Polypeptidrückgrat handelt oder ob es zu einer Hydrolyse der Zucker zum Monosaccharid kommt.

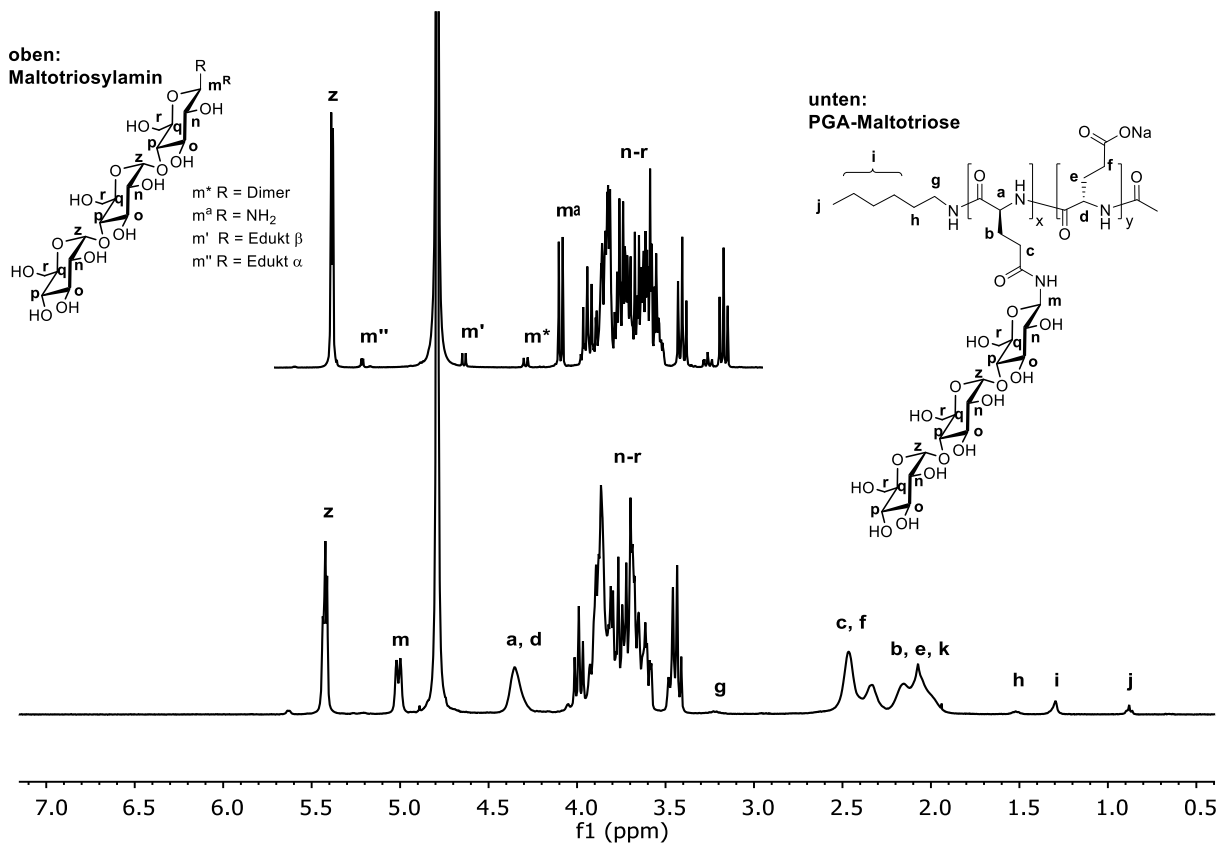


Abb. 4-7  $^1\text{H}$ -NMR Spektren von  $\beta$ -D-Maltotriosylamin (oben) und PGA-Maltotriose [DS 61, DP 54] (unten)

Da sich das Signal des Protons an den 1,4-Verknüpfungsstellen auch im Spektrum des Glycopolypeptids nach der Amidkupplung findet, kann davon ausgegangen werden, dass die An-

bindung von Maltotriose (Abb. 4-7) und den anderen Mehrfachzuckern (Anhang 8 – Anhang 10) erfolgreich war.

Eine Übersicht der erhaltenen Glycosylierungsgrade und Kupplungseffizienzen für alle angebunden Di- und Trisaccharide (vgl. Abb. 4-3) findet sich in Tabelle 4-5. Interessanterweise zeigt sich ein sehr konformes Bild zum angebundenen Monosaccharid Glucosylamin (vgl. Tabelle 4-4). Für gleiche DMT-MM:PGA-Verhältnisse werden unabhängig vom verwendeten Zucker ähnliche Glycosylierungsgrade und Kupplungseffizienzen erhalten. Analog zum korrespondierenden Monosaccharid wird auch für die Mehrfachzucker ein Einbruch der Kupplungseffizienz mit steigendem Glycosylierungsgrad beobachtet. Aufgrund des deutlich höheren Raumanspruchs von Maltotriose verglichen mit Glucose, wäre jedoch ein stärkerer sterischer Effekt und damit eine deutlich schlechtere Kupplungseffizienz zu vermuten gewesen. Dies konnte so nicht belegt werden. Obwohl die verwendeten Di- und Trisaccharide einen deutlich höheren Platzbedarf haben, werden sie vergleichbar zum Monosaccharid an das Polypeptid angebunden. Für die Anbindung scheint daher nur die unmittelbare Umgebung am Peptidrückgrat eine Rolle zu spielen. Veränderte Zuckerreste wie bei der Lactose in weiterer Entfernung vom Peptidrückgrat (zweiter Zucker Galactose statt Glucose) oder Unterschiede in der Verknüpfung der Zuckereinheiten ( $\alpha$ -1,4 bei Maltobiose und Maltotriose bzw.  $\beta$ -1,4 bei Cellobiose und Lactose), sowie die Größe des anzubindenden Rests, scheinen hingegen keine Rolle für die Anbindungsreaktion und Kupplungseffizienz zu spielen.

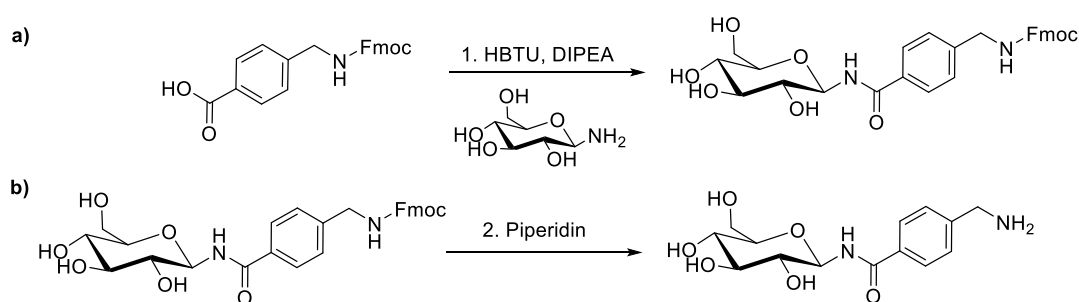
**Tabelle 4-5 Erhaltene Glycosylierungsgrade und Kupplungseffizienzen der Amidkupplungsreaktion für Di- und Trisaccharide (\*bestimmt über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie)**

<b>DMT-MM [eq.]</b>	<b>Maltobiose</b>		<b>Lactose</b>		<b>Cellobiose</b>		<b>Maltotriose</b>	
	<b>DS* [%]</b>	<b>Kupplungs- effizienz</b>	<b>DS* [%]</b>	<b>Kupplungs- effizienz</b>	<b>DS* [%]</b>	<b>Kupplungs- effizienz</b>	<b>DS* [%]</b>	<b>Kupplungs- effizienz</b>
<b>0.1</b>	7.6	76 %	6.8	68 %	6.8	68 %	6.9	69 %
<b>0.25</b>	20.4	82 %	18.6	74 %	17.9	72 %	20.4	82 %
<b>0.5</b>	40.3	81 %	36.2	72 %	36.3	73 %	39.4	79 %
<b>1</b>	64.4	64 %	54.3	54 %	55.2	55 %	60.8	61 %
<b>2</b>	80.0	40 %	79.9	40 %	74.2	37 %	80.3	40 %



#### 4.4.3 Synthese und Anbindung eines aromatischen Spacers (Glu-C<sub>ar</sub>-NH<sub>2</sub>)

Bei den zuvor besprochenen und angebundenen Zuckern handelt es sich um hydrophile Substituenten. Es gibt aber Hinweise darauf, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität der Seitenketten sowohl die Ausbildung von Sekundärstrukturen in wässrigen Lösungen als auch die Interaktion mit Lektinen begünstigt.<sup>[31, 93, 123]</sup> So konnte LOTAN et al. zeigen, dass die Stabilität der Helix bei polymeren *N*<sup>5</sup>-( $\omega$ -hydroxyalkyl)-L-Glutaminen mit steigender Zahl *n* an Methylengruppen in der Seitenkette (*n* = 0-4) zunimmt.<sup>[123]</sup> Dies wird im Wesentlichen mit der Zunahme hydrophober Bindungen zwischen den Seitenketten erklärt. Um in späteren Lektinwechselwirkungen den Einfluss hydrophober Seitenketten zu untersuchen, wurde ergänzend zu den hydrophilen Mono-, Di- und Trisacchariden Glucose über einen aromatischen Spacer an das Polyglutaminsäure-Rückgrat angebunden. Der aromatische Ring in der Seitenkette ist nicht nur sehr hydrophob, sondern kann durch die  $\pi$ -Bindungen des Ringsystems eventuell zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Helix durch  $\pi$ -Stacking führen. Um eine vergleichbare Anbindung zu den Mehrfachzuckern zu haben, muss ein bifunktioneller Spacer verwendet werden. Im ersten Schritt kann dann das Glucosylamin an eine Carboxylgruppe des Spacers angebunden werden. Zusätzlich muss der Spacer über eine geschützte Aminfunktion verfügen, die im zweiten Reaktionsschritt entschützt wird. Dies ermöglicht, dass der Spacer analog zu den Zuckern über eine Amidkupplung mit DMT-MM an die Polyglutaminsäure angebunden werden kann. Die Herstellung des aromatischen Spacers (Glu-C<sub>ar</sub>-NH<sub>2</sub>) erfolgte in Anlehnung an einen mit Galactose-funktionalisierten Spacer von R. MILDNER.<sup>[93, 124]</sup> Beide Synthesevorschriften basieren auf der Vorschrift für einen Hexylspacer von POLIZZOTTI und KILICK.<sup>[31]</sup> Für die Synthese des Spacers wurde  $\beta$ -D-Glucosylamin mit 4-(Fmoc-amino-methyl)benzoesäure in einer Amidkupplungsreaktion mit HBTU umgesetzt. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe basisch abgespalten, sodass wieder eine freie Aminogruppe für die Kupplung an die PGA zur Verfügung stand. Das Reaktionsschema findet sich in Abb. 4-8.



**Abb. 4-8 Reaktionsschema für die Synthese des glycosylierten aromatischen Spacers (Glu-C<sub>ar</sub>-NH<sub>2</sub>)**  
 a) Amidkupplungsreaktion mit HBTU, b) basische Abspaltung der Schutzgruppe

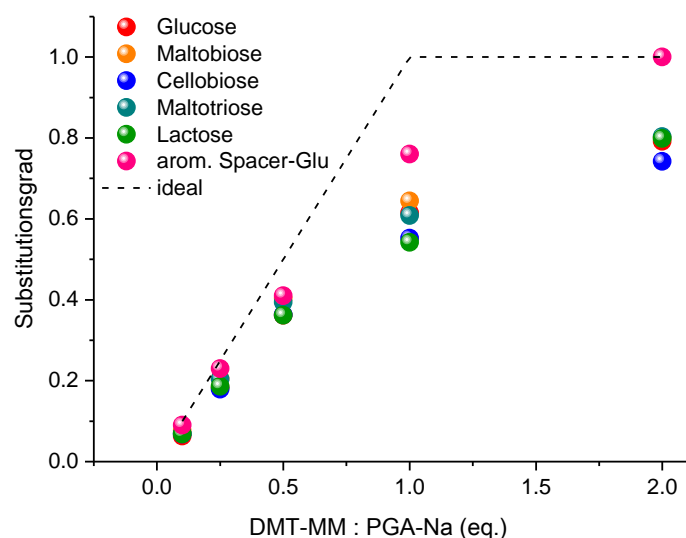
Durch eine Modifikation der Synthesevorschrift (s. Kapitel 9.4) konnte die Ausbeute bei der Herstellung des Glucose-funktionalisierten Spacers deutlich gesteigert werden (81 %) gegenüber der Ausbeute von R. MILDNER für den Galactose-funktionalisierten Spacer (34 %).<sup>[124]</sup> Die Charakterisierung erfolgte über  $^1\text{H-NMR}$ - sowie über FTIR-Spektroskopie (s. Anhang 11 und Anhang 22). Im IR-Spektrum finden sich die neugebildete Amid-I-Bande bei ca.  $1640\text{ cm}^{-1}$  und die Amid-II-Bande bei ca.  $1535\text{ cm}^{-1}$ , was auf eine erfolgreiche Kupplung von Spacer und Zucker hindeutet. Anhand der chemischen Verschiebung des anomeren Wasserstoffs der Glucose (5.20 ppm) im  $^1\text{H-NMR}$  ergibt sich, dass die  $\beta$ -Konfiguration auch nach der Kupplungsreaktion erhalten bleibt. Die Konfiguration stimmt demnach mit der Konfiguration in den Glycopolypeptiden überein, die mit Mono-, Di- und Trisacchariden funktionalisiert sind.

Für die Anbindung des glycosylierten Spacers an das PGA-Rückgrat wurden zunächst Testreaktionen mit dem Spacer als freies Amin ( $\text{Glu-C}_{\text{ar}}\text{-NH}_2$ ), sowie äquimolar mit HCl angesäuert als Hydrochlorid ( $\text{Glu-C}_{\text{ar}}\text{-NH}_3^+\text{Cl}^-$ ), durchgeführt. Der Spacer wurde jeweils im doppelten Überschuss zum DMT-MM eingesetzt. Es wurde eine PGA-Na mit einem Polymerisationsgrad von  $\text{DP} = 49$  verwendet. Die Bestimmung des Substitutionsgrades erfolgte wie bei den Glycopolypeptiden ebenfalls über  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Anders als bei den Zuckern musste der Substitutionsgrad über die Signale des Aromaten im Verhältnis zum Signal der Seitenketten Methylengruppen der PGA bestimmt werden, da die sonst verwendeten Signale des Zuckergerüsts und der Methingruppe des PGA-Rückgrats mit anderen Signalen überlagern. Die Ergebnisse der Testreaktionen mit dem Spacer als freies Amin und als Hydrochlorid finden sich in Tabelle 4-6. Es zeigt sich, dass die Kupplungseffizienzen für den glycosylierten Spacer in der Hydrochlorid-Form deutlich höher sind als für denselben Spacer als freies Amin.

**Tabelle 4-6 Ergebnisse der Amidkupplungsreaktion des Spacers  $\text{C}_{\text{ar}}$ -Glucose mit DMT-MM als freies Amin und in Hydrochlorid-Form, \*über  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt**

	PGA-Na [eq.]	DMT-MM [eq.]	Spacer [eq.]	DS*	Kupplungs- effizienz [%]
$\text{Glu-C}_{\text{ar}}\text{-NH}_2$	1	0.5	1	30.4	61 %
$\text{Glu-C}_{\text{ar}}\text{-NH}_3^+\text{Cl}^-$	1	0.5	1	48.8	97 %

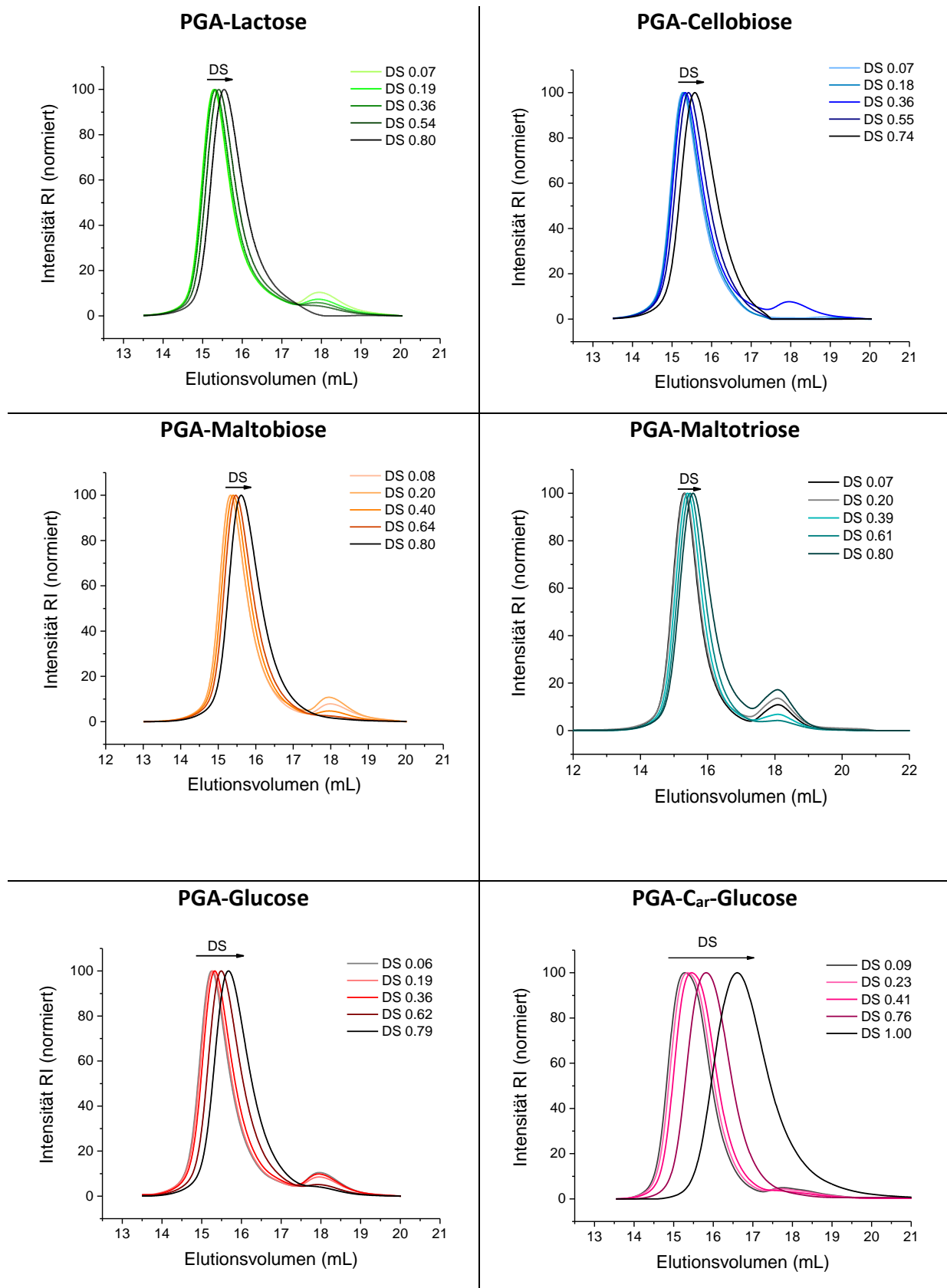
Für die folgenden Reaktionen wurde daher die Hydrochlorid-Form des Spacers gewählt. Analog zu den DMT-MM Kupplungen mit den Zuckern (vgl. Kapitel 4.4.1 und 4.4.2) wurden jeweils fünf verschiedene Kupplungsverhältnisse getestet. Die erhaltenen Substitutionsgrade wurden gegen das DMT-MM- zu PGA-Na-Verhältnis aufgetragen (Abb. 4-9). Als Vergleich sind zusätzlich die erhaltenen Glycosylierungsgrade der angebunden Zucker gezeigt. In gestrichelt wird der für das DMT-MM : PGA-Na Verhältnis maximal mögliche Substitutionsgrad dargestellt. Für niedrige Glycosylierungsgrade ( $DS \leq 0.5$ ) zeigen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den Polypeptiden, die mit glycosylierten Spacer funktionalisiert sind und den mit Mono-, Di- und Trisacchariden. Alle Proben sind relativ nah am idealen Verlauf. Für höhere Glycosylierungsgrade beobachtet man eine verbesserte Anbindung des Spacers gegenüber den Zuckern. Dies könnte an den aromatischen Gruppen des Spacers liegen: Liegt bereits eine hohe Zahl an aromatischen Gruppen vor, wird die Anlagerung weiterer aromatischer Gruppen sowohl vom DMT-MM als auch vom Spacer durch  $\pi$ -Wechselwirkungen begünstigt. Dadurch kann es zu einem vermehrten Einbau des Spacers verglichen mit den Zuckern kommen. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass bei höheren Substitutionsgraden durch die gesteigerte Helizität der mit Spacer funktionalisierten PGA, die noch unreaktierten Carboxylatgruppen besser positioniert sind und deutlicher aus dem Peptidrückgrat herausstehen als in ungeordneter Knäuel-Konformation, was ebenfalls einen verstärkten Einbau des Spacers begünstigen kann.



**Abb. 4-9** Erzielte Substitutionsgrade der Amidkupplungsreaktionen mit DMT-MM für Glycopolypeptide mit Mono-, Di-, Trisacchariden sowie mit aromatischem Spacer ( $\text{Glu-C}_{\text{ar}}\text{-NH}_3^+\text{Cl}^-$ )

#### 4.4.4 Bestimmung der Molekulargewichtsverteilungen der Glycopolypeptide

Zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilungen der hergestellten Glycopolypeptide wurden GPC-Messungen in Phosphatpuffer bei pH 7.4 durchgeführt (dreifach Bestimmung). Für alle produzierten Glycopolypeptide konnten ähnlich enge Molekulargewichtsverteilungen ( $\sigma \leq 1.1$ ), wie für die ursprüngliche PGA, erhalten werden. Dies spricht dafür, dass es bei der Anbindung der Zucker nicht zu unerwünschten Nebenreaktionen, wie beispielsweise Quervernetzungen der Peptidketten, kommt. Darüber hinaus deutet es daraufhin, dass die Zuckerreste gleichmäßig über das Peptidrückgrat verteilt sind und die Ketten in Lösung stabil sind ohne zu aggregieren. Dies gilt auch für die Polypeptide mit dem aromatischen Spacer. Betrachtet man die Molekulargewichtsverteilungen (Abb. 4-10) fällt auf, dass sich die Kurven mit steigendem Glycosylierungsgrad zu späteren Elutionsvolumen verschieben. Intuitiv würde man mit steigendem Molekulargewicht eine Abnahme des Elutionsvolumen erwarten, da bei der Größenausschlusschromatographie „größere“ Moleküle zuerst eluiert werden. Die „Größe“, die bei GPC Messungen gemessen wird, ist jedoch nicht direkt das Molekulargewicht, sondern das hydrodynamische Volumen der Moleküle – also wieviel Raum sie in Lösung einnehmen. Die Verschiebung der Elutionsvolumina bedeutet daher, dass die Ketten mit steigendem Glycosylierungsgrad eine dichtere Packung in Lösung einnehmen. Die wahrscheinlichste Ursache hierfür sind elektrostatische Gründe. Je niedriger der Glycosylierungsgrad, desto mehr freie Carboxylatgruppen liegen im Polypeptid vor. Die negativen Ladungen der Carboxylatgruppen versuchen einen möglichst weiten Abstand zueinander einzunehmen, um die Ladungsabstoßung zu minimieren. Die Polypeptidkette liegt daher aufgeweitet vor. Je mehr Carboxylatgruppen mit Zuckern oder Spacer funktionalisiert wurden, desto weniger sich abstoßende Ladungen liegen in der Polypeptidkette vor. Es kann daher eine kompaktere Anordnung eingenommen werden. Besonders deutlich wird dies für die Polyglutaminsäure mit dem aromatischen Spacer (PGA-C<sub>ar</sub>-Glu). Hier konnte eine vollständige Funktionalisierung (DS 100 %) erzielt werden, weshalb die Verschiebung des Elutionsvolumens und damit die Abnahme des hydrodynamischen Radius um einiges stärker ausgeprägt ist, als für die übrigen Glycopolypeptide (max. DS 80 %).



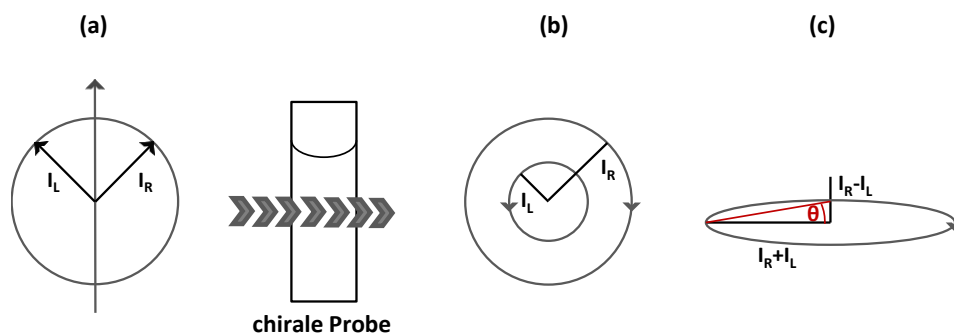
**Abb. 4-10 Über GPC bestimmte Molekulargewichtsverteilungen der hergestellten Glycopolypeptide, RI-Signal normiert auf 100**

## 5 Circular dichroismus-Spektroskopie

Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) ist seit den 1960er Jahren eine weitverbreitete Methode zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden in Lösungen. Chirale Moleküle absorbieren links und rechts zirkular polarisiertes Licht in unterschiedlichem Ausmaß ( $\epsilon_L \neq \epsilon_R$ ). Dieses COTTON-Effekt genannte Phänomen stellt die Basis für die CD-Spektroskopie dar. Die Differenz der Extinktionskoeffizienten von rechts- und links-circular polarisiertem Licht wird als circularer Dichroismus bezeichnet und ist die Größe, die von gängigen CD-Spektrometern über die Differenz der Absorbanzen gemessen wird (5-1). Die Probe wird dabei periodisch wechselnd von rechts- und links-circular polarisiertem Licht durchstrahlt.<sup>[125, 126]</sup>

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = \frac{\Delta A}{c \cdot l} \quad (5-1)$$

Obwohl sowohl die Absorbanz als auch der Extinktionskoeffizient gängige Größen in der Spektroskopie sind, wird aus historischen Gründen bei der CD-Spektroskopie auch heute noch häufig die Elliptizität verwendet. Eine Überlagerung von rechts- und links circular polarisiertem Licht gleicher Amplitude, Wellenlänge und Phase ergibt linear polarisiertes Licht. Wird linear polarisiertes Licht durch eine optisch aktive Probe gestrahlt, wird elliptisch polarisiertes Licht erhalten, da die Amplitude der stärker absorbierenden Komponente kleiner ist als die, der weniger stark absorbierenden Komponente. Die Gestalt der resultierenden Ellipse wird über die Elliptizität  $\theta$  beschrieben (vgl. Abb. 5-1).<sup>[125]</sup>



**Abb. 5-1 (a) Überlagerung von links und rechts circular polarisiertem Licht gleicher Intensität resultiert in linear polarisiertem Licht, (b) nach Durchgang durch eine chirale Probe haben links und rechts circular polarisiertes Licht unterschiedliche Intensitäten (c) Kombination aus links und rechts circular polarisiertem Licht ergibt elliptisch polarisiertes Licht. Die Form der Ellipse wird durch den Winkel  $\theta$  beschrieben**

Die Elliptizität  $\theta$  und die Differenz der Absorbanzen  $\Delta A$  lassen sich über die KRAMERS-KRONIG-Transformation direkt in einander umwandeln (5-2):<sup>[125]</sup>

$$\theta = \ln 10 \cdot \frac{180}{4\pi} \cdot 1000 \cdot \Delta A = 32982 \cdot \Delta A \quad [\text{mdeg}] \quad (5-2)$$

Da die Absorbanz und damit auch die Elliptizität nach LAMBERT-BEER's Gesetz konzentrationsabhängig sind, wird zur besseren Vergleichbarkeit die molare Elliptizität  $[\theta]_M$  (5-3) verwendet.

$$[\theta]_M = \frac{100 \cdot \theta}{c \cdot l} \quad [\text{deg} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2] \quad (5-3)$$

Da es sich bei Polypeptiden und Proteinen um Polymere handelt, wird die molare Elliptizität in diesem Fall in der Regel auf eine Aminosäureeinheit bezogen. Unter Berücksichtigung des mittleren Molekulargewichts einer Aminosäureeinheit  $M_{MRW}$  und der Massenkonzentration  $c'$  ergibt sich (5-4):

$$[\theta]_{MRW} = \frac{100 \cdot \theta \cdot M_{MRW}}{c' \cdot l} \quad [\text{deg} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2] \quad (5-4)$$

Das CD-Spektrum wird erhalten, wenn die molare Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen wird. Für Polypeptide wird in der Regel der Bereich von 180-250 nm betrachtet. In diesem Wellenlängenbereich absorbiert die Amidgruppe des Peptidrückgrats und es werden je nach Sekundärstruktur charakteristische Absorptionsbanden im Spektrum beobachtet (s. Abb. 5-2).

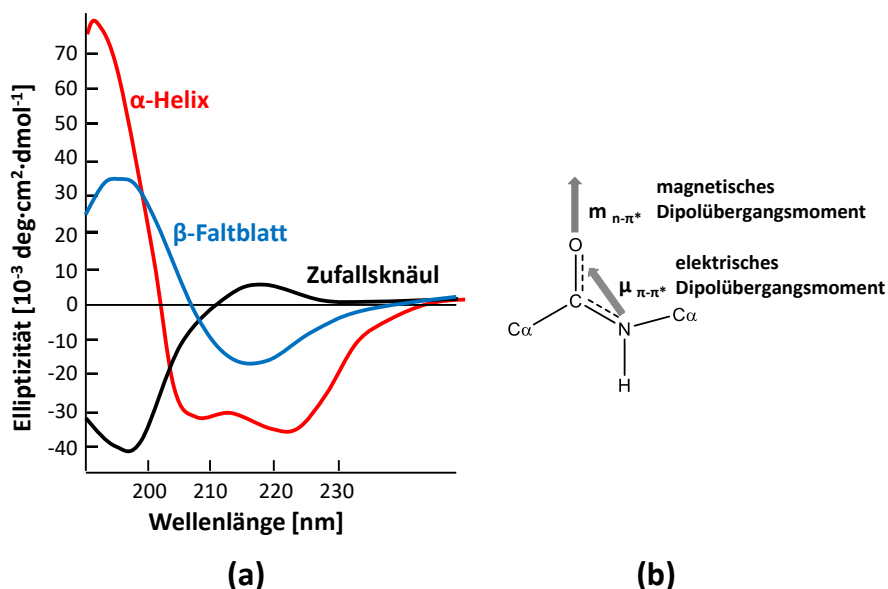


Abb. 5-2 (a) CD-Spektren unterschiedlicher Sekundärstrukturen, (b) für die Absorptionsbanden verantwortliche Dipolübergangsmomente

$\alpha$ -helikale Polypeptide weisen zwei starke negative Absorptionsbanden bei 208 nm ( $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang) und 222 nm ( $n$ - $\pi^*$ -Übergang) sowie eine positive bei 192 nm ( $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang) auf, während  $\beta$ -Faltblätter eine negative Absorptionsbande bei 215 nm ( $n$ - $\pi^*$ -Übergang) und eine positive bei 195 nm ( $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang) zeigen. Die Spektren unterscheiden sich damit deutlich von ungeordneten Polypeptiden, die eine charakteristische negative Bande bei 198 nm ( $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang) haben. Häufig weisen ungeordneten Polypeptide zusätzlich eine positive Absorptionsbande bei 218 nm ( $n$ - $\pi^*$ -Übergang) auf, die auf das Vorliegen einer Polyprolin-II-Helix hindeutet.<sup>[127]</sup> Das Polypeptid liegt dann zwar nicht komplett ungeordnet vor, in der Literatur werden aber auch solche Polypeptide der Einfachheit halber als ungeordnet bzw. Zufallsknäul bezeichnet. Liegen mehrere Sekundärstrukturen nebeneinander vor, ist das resultierende Spektrum eine anteilig gewichtete Überlagerung der in Abb. 5-2 gezeigten Sekundärstrukturen. Das Gesamtspektrum setzt sich dann additiv gemäß (5-5) zusammen, wobei  $f_\alpha$ ,  $f_\beta$  und  $f_{coil}$  die jeweiligen Anteile an  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Zufallsknäul sind. Es gilt dann  $f_\alpha + f_\beta + f_{coil} = 1$ .

$$[\theta]_{MRW} = f_\alpha [\theta]_\alpha + f_\beta [\theta]_\beta + f_{coil} [\theta]_{coil} \quad (5-5)$$

Für Proteine handelt es sich hierbei um eine grobe Näherung, da weitere Strukturelemente ( $\beta$ -Schleife,  $\beta$ -Helix, etc.) vernachlässigt werden. Synthetische Polypeptide aus einer Aminosäureeinheit wie bspw. Polyglutaminsäure haben in der Regel jedoch eine deutlich einfachere Sekundärstruktur als Proteine, sodass mit dieser Näherung gearbeitet werden kann. Treten als Sekundärstrukturen nur  $\alpha$ -Helix und Zufallsknäul auf, lässt sich die Helizität des Polypeptids über Formel (5-6) berechnen.

$$f_\alpha = \frac{-[\theta]_{MRW, 222 \text{ nm}} + [\theta]_{100\% \text{ Knäul}, 222 \text{ nm}}}{[\theta]_{100\% \text{ Helix}, 222 \text{ nm}}} \quad (5-6)$$

Für die Bestimmung der Helizität einer Probe ist dabei die Kenntnis der molaren Elliptizitäten einer kompletten  $\alpha$ -Helix und eines komplett ungeordneten Zufallsknäuls nötig. Da diese Werte nicht zugänglich sind, wurde als Referenzsubstanz von GREENFIELD und FASMAN Poly-L-lysin vorgeschlagen, da dieses sowohl  $\alpha$ -helikal als auch als  $\beta$ -Faltblatt und Zufallsknäul vorliegen kann. Um die Helizität zu bestimmen, werden dann üblicherweise die molaren Elliptizitäten bei 222 nm ( $n$ - $\pi^*$  Übergang,  $\alpha$ -Helix) herangezogen und die empirischen Werte vom Poly-L-lysin ( $[\theta]_\alpha = -39000 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  und  $[\theta]_{Knäul} = 3000 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ) in Formel (5-6) eingesetzt.<sup>[128]</sup> Hierbei ist zu beachten, dass die Gesamthelizität und damit die empirischen



Werte maßgeblich vom Polymerisationsgrad abhängig sind. Bei kurzkettigen Polypeptiden und Oligopeptiden haben Endgruppen-Effekte einen großen Einfluss auf die Helizität. Für eine Umdrehung einer  $\alpha$ -Helix werden 3.6 Aminosäurereste benötigt. An den beiden Enden des Polypeptids kann sich somit keine vollständige Helix ausbilden. Je größer das Polypeptid, desto kleiner ist der Einfluss der Endgruppen-Effekte auf die Helizität.

## 5.1 Sekundärstrukturen von Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure

Es ist ein schon lange bekanntes und gut untersuchtes Phänomen, dass Polypeptide mit ionisierbaren Seitenketten in Bezug auf die Sekundärstruktur pH-responsives Verhalten zeigen.<sup>[109, 127, 129–131]</sup> DOTY et al. konnten 1957 beweisen, dass die Konformation von Poly-L-glutaminsäure (PGA) vom pH-Wert der Lösung abhängig ist. Sie konnten zeigen, dass PGA in einer 0.2 M NaCl-Lösung verdünnt in Dioxan (1:1) im sauren pH-Bereich helikal vorliegt, während es bei höheren pH-Werten ein Zufallsknäul ausbildet.<sup>[109]</sup> Auch andere Polypeptide wie Polylysine und Polyasparaginsäure zeigen ein ähnliches pH-responsives Verhalten.<sup>[129]</sup> Bei einem niedrigen pH-Wert liegen die Carboxylgruppen der Polyglutaminsäure protoniert vor (COOH) und es bildet sich, unterstützt durch Wasserstoffbrückenbindungen, eine  $\alpha$ -Helix aus. Mit zunehmendem pH-Wert werden die Carboxylgruppen deprotoniert, sodass die Seitenketten in ionisierter Form vorliegen (COO<sup>-</sup>). Dadurch nimmt die elektrostatische Abstoßung der Seitenketten zu und die  $\alpha$ -Helix wird destabilisiert. Der Abstand der Seitenketten in einem Zufallsknäul ist größer als in helikaler Konformation, sodass bei höheren pH-Werten die Ausbildung des Zufallsknäuls begünstigt ist.<sup>[130]</sup> Über CD-Spektroskopie-Messungen oder potentiometrische Titration lässt sich der sogenannte Helix-Knäul-Übergang von der  $\alpha$ -Helix zum Zufallsknäul experimentell bestimmen. Für Poly-L-glutaminsäure liegt der Übergang je nach Salz- und Polymerkonzentration zwischen pH 4 und pH 5. Die weitere Protonierung der Carboxylatgruppen unterhalb von pH 4 reduziert jedoch die Löslichkeit der PGA drastisch, sodass bei pH-Werten  $\leq 3$  die  $\alpha$ -helikale PGA unlöslich wird und ausfällt.

In den letzten Jahren rückten Glycopolypeptide vor allem im Hinblick auf die Anwendung in Drug-Delivery-Systemen in den Fokus der Forschung. Bisher gibt es jedoch relativ wenige Untersuchungen dazu, wie die Anbindung von Zuckern das pH-responsive Verhalten beeinflusst. R. MILDNER hat untersucht, welchen Einfluss mittlere und hohe Glycosylierungsgrade mit einfachen Monosacchariden wie Galactosylamin und *N*-Acetylglucosamin auf den Helix-

Knäul-Übergang von PGA haben.<sup>[92, 124]</sup> Er konnte zeigen, dass Glycopolypeptide mit niedrigen und mittleren Glycosylierungsgraden ein ähnliches pH-responsives Verhalten, wie reine PGA zeigen. Glycopolypeptide mit hohen Substitutionsgraden jedoch keinen oder nur einen geringen pH-abhängigen Helix-Knäul-Übergang aufweisen und pH-unabhängig als Zufallsknäul vorliegen. Es wird angenommen, dass dies an der Hydrophilie der angebundenen Zucker liegt und es dadurch zu interferierenden Wasserstoffbrückenbindungen kommt, die die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix stören.<sup>[92]</sup>

Bisher gibt es noch keine systematischen Untersuchungen dazu, auf welche Art größere Zucker wie Di- und Trisaccharide das pH-responsive Verhalten von Glycopolypeptiden beeinflussen. Dabei stellen gerade größere Zuckereinheiten eine interessantere Modifikation dar als Monosaccharide, da für Zucker-Lektin-Wechselwirkungen höhere Affinitäten und spezifischere Interaktionen erwartet werden können.

Um den Einfluss der angebundenen Di- und Trisaccharide besser beurteilen zu können, wurden zunächst die zugrundeliegenden Poly-L-glutaminsäuren untersucht. Hierfür wurden CD-Spektren aus 0.01 M NaCl-Lösung mit einer Polymerkonzentration von 0.2 mg/mL bei unterschiedlichen pH-Werten aufgenommen und der Helix-Knäul-Übergang bestimmt (s. Abb. 5-3).

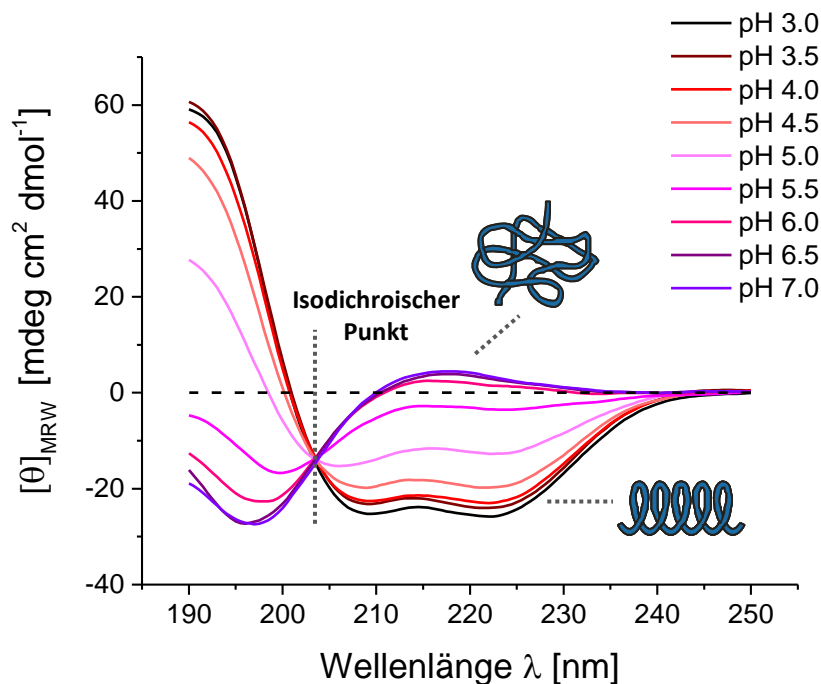


Abb. 5-3 CD-Spektren von PGA-Na bei unterschiedlichen pH-Werten (0.2 mg/mL in 0.01 M NaCl-Lösung, pH-Wert mit HCl-Lösung eingestellt)

Für den niedrigen pH-Bereich sind die für eine  $\alpha$ -Helix charakteristischen Minima bei 208 nm und 222 nm zu sehen, während im neutralen pH-Bereich das typische Spektrum eines Zufallsknäuls mit einer negativen Absorptionsbande bei 198 nm vorliegt. Alle Spektren schneiden sich im isodichroischen Punkt bei 204 nm. Dies zeigt, dass als Sekundärstrukturelemente ausschließlich Zufallsknäul und  $\alpha$ -Helix auftreten. Somit ist eine Auswertung der Helizität über (5-6) möglich. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten PGAs findet sich in Tabelle 5-1. Die Polymerisationsgrade liegen überwiegend bei etwa 50-60 Wiederholungseinheiten mit einer maximalen Helizität von ungefähr 80 %. Wie bereits erwähnt tritt bei vergleichsweise kurzen Polypeptiden ein Endgruppen-Effekt auf, der verhindert, dass komplett helikale Strukturen erhalten werden. Für eine Umdrehung einer  $\alpha$ -Helix werden 3,6 Aminosäureeinheiten benötigt, sodass im Polypeptid ca. 8 Wiederholungseinheiten nicht für die Ausbildung einer Helix zur Verfügung stehen, was bei einem Polymerisationsgrad von ca. 50 etwa 16 % aller Wiederholungseinheiten entspricht und eine maximale Helizität von rund 80 % erklärt. Für langkettigere Polypeptide wie beispielsweise PGA 7 mit einem Polymerisationsgrad von 100 werden entsprechend höhere Helizitäten erhalten. Mit 97 % Helizität liegt annähernd die komplette Polypeptidkette  $\alpha$ -helikal vor.

**Tabelle 5-1 Über CD-Spektroskopie bestimmte maximale Helizitäten der verwendeten PGAs**

<b>Bezeichnung</b>	<b>DP</b>	<b>max. Helizität (pH <math>\leq</math> 3.5)</b>
<b>PGA 1</b>	62	81 %
<b>PGA 2</b>	60	82 %
<b>PGA 4</b>	54	84 %
<b>PGA 5</b>	49	81 %
<b>PGA 6</b>	53	74 %
<b>PGA 7</b>	100	97 %

## 5.2 Sekundärstrukturen von Glycopolyptiden

An die in Tabelle 5-1 gezeigten Polyglutaminsäuren wurden mittels wässriger Amidkupplung mit DMT-MM Glucosylamin und verschiedene auf Glucose-basierende Di- und Trisaccharide (Maltobiosyl-, Cellobiosyl-, Lactosyl-, Maltotriosylamin) angebunden. Eine Übersicht über die erhaltenen Glycopolyptide ist in Abb. 5-4 zu finden. Für jeden der Zucker wurden Polypeptide mit verschiedenen Glycosylierungsgraden hergestellt und das pH-abhängige Verhalten mittels CD-Spektroskopie untersucht.

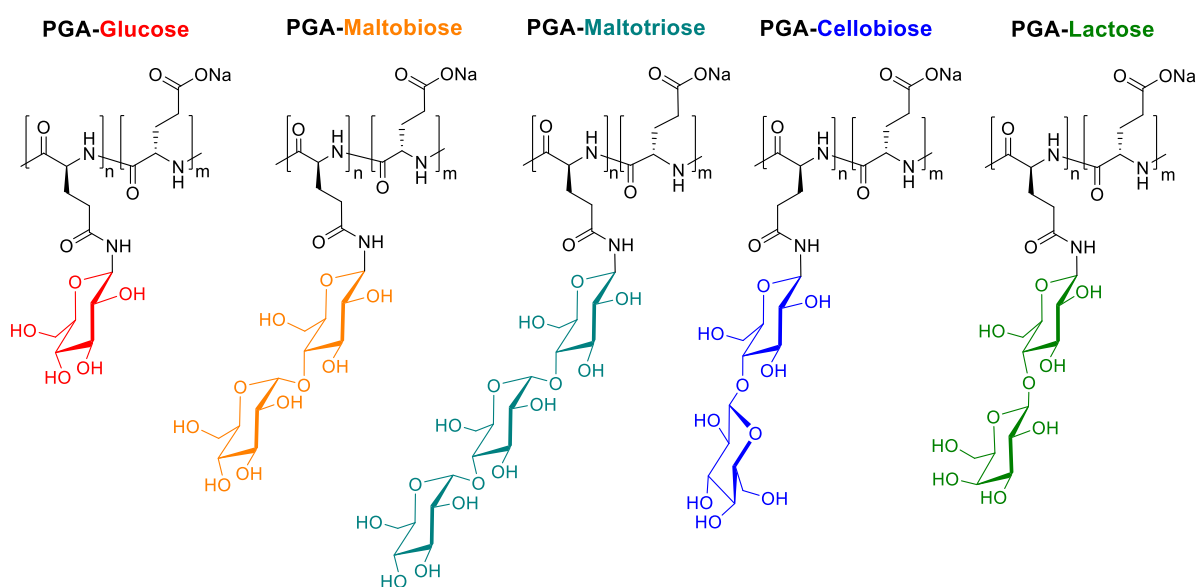


Abb. 5-4 Übersicht über die untersuchten Glycopolyptide

Ähnlich wie bei der PGA ist in den Spektren der Glycopolyptide ein isodichroischer Punkt bei 204 nm zu beobachten (Anhang 31-Anhang 35), was eine Berechnung der Helizität über (5-6) erlaubt. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Amidbindungen des PGA-Rückgrats nicht mehr die einzigen im Molekül sind. Die (chiralen) Zucker sind ebenfalls über Amidbindungen an das Rückgrat gebunden, sodass für die Bestimmung der Helizität, der Anteil dieser Bindungen aus dem Spektrum herausgerechnet werden muss. Gleichung (5-6) muss daher um einen Term erweitert werden, der den Beitrag der Seitenketten in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad berücksichtigt (5-7):

$$f_{\alpha} = \frac{-[\theta]_{\text{MRW}, 222 \text{ nm}} + [\theta]_{100\% \text{ Knäul}, 222 \text{ nm}} + \text{DS} \cdot [\theta]_{\text{Seitenkette}, 222 \text{ nm}}}{[\theta]_{100\% \text{ Helix}, 222 \text{ nm}}} \quad (5-7)$$

Um den Einfluss der Amidbindungen in den Seitenketten abzuschätzen, wurde als Referenzsubstanz *N*-Acetylglucosamin verwendet. *N*-Acetylglucosamin weist bei 222 nm eine molare

Elliptizität von  $-2000 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  auf.<sup>[124]</sup> Dieser Wert wurde zur Bestimmung des Anteils der Seitenketten im Gesamtspektrum für  $[\theta]_{\text{Seitenkette}, 222 \text{ nm}}$  in (5-7) eingesetzt.

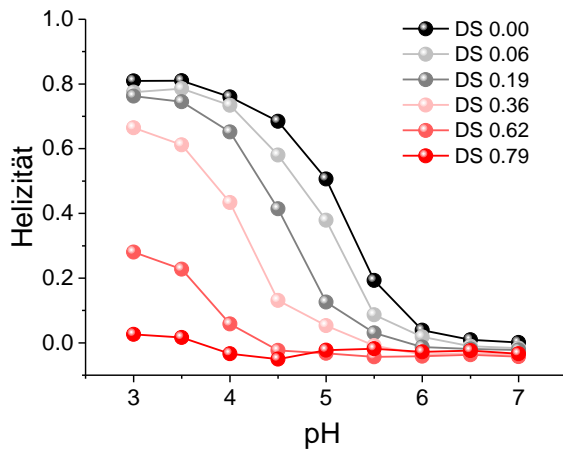
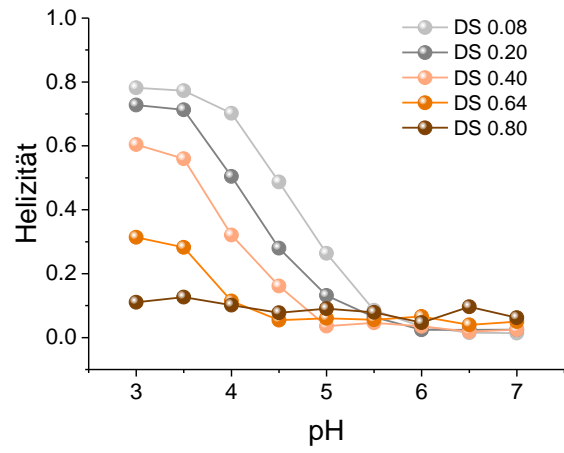
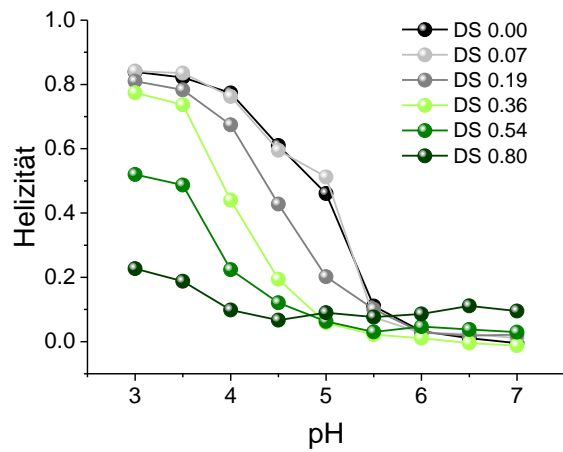
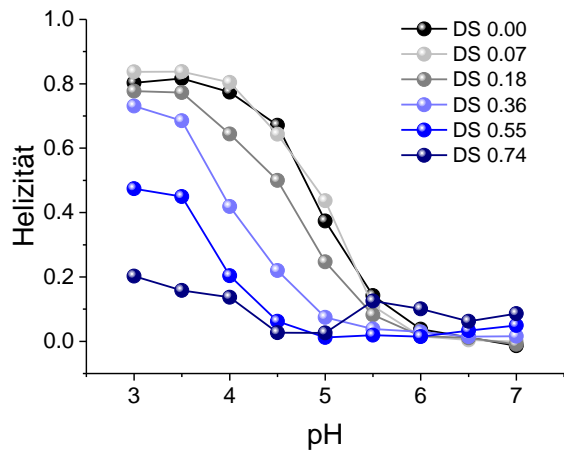
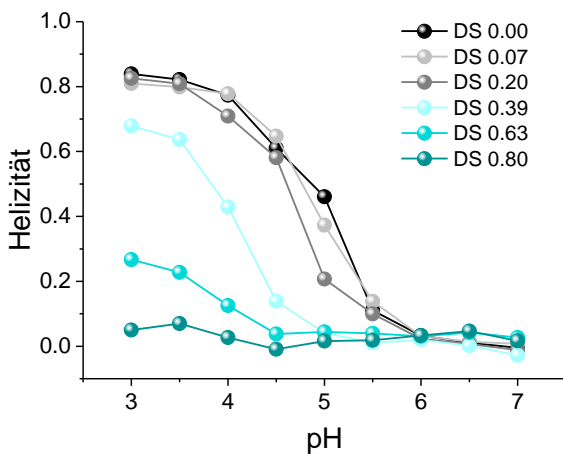
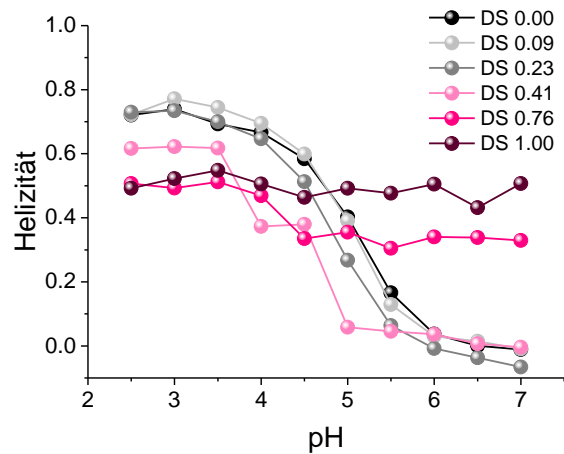
Um die unterschiedlichen Glycopolyptide besser miteinander vergleichen zu können und den Helix-Knäul-Übergang zu bestimmen, wurde für alle Glycopolyptide die Helizität gegen den pH-Wert aufgetragen (Abb. 5-5). Für alle fünf getesteten Glycopolyptide sind ähnliche Trends zu beobachten. Mit steigendem Glycosylierungsgrad nimmt die Helizität ab, sodass beim maximal erreichbaren Glycosylierungsgrad von 80 % die Glycopolyptide über den kompletten pH-Bereich ungeordnet vorliegen. Darüber hinaus fällt auf, dass sich der Helix-Knäul-Übergang mit steigender Zuckerdichte weiter ins Saure verschiebt. Für reine Polyglutaminsäure liegt der Übergang ungefähr bei pH 5. Bei einem Substitutionsgrad von 60 % liegt der Helix-Knäul-Übergang bereits nur noch bei pH 4. Allerdings ist hier auch nur eine maximale Helizität von 30 % möglich, was deutlich unterhalb der Helizität unsubstituierter Polyglutaminsäure liegt. Wie bereits erwähnt, wird die Ausbildung der Helix im sauren pH-Bereich normalerweise begünstigt, weil dann weniger Carboxylat-Anionen ( $\text{COO}^-$ ) vorliegen und es somit zu weniger elektrostatischen Abstoßungen der Seitenketten kommt. Durch die Glycosylierung nimmt insgesamt die Menge an Carboxylat-Anionen ab, sodass von vorneherein weniger elektrostatischen Abstoßungen möglich sind. Man könnte also erwarten, dass höhere Helizitäten mit steigendem Glycosylierungsgrad möglich sind. Die Ergebnisse zeigen jedoch eine Abnahme der Helizität und damit den gegenläufigen Trend. Ähnliches wurde bereits von R. MILDNER für verschiedene Monosaccharide festgestellt.<sup>[92]</sup> Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen sein. Die Zucker verfügen über viele OH-Gruppen, die theoretisch für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung stehen. Auch die  $\alpha$ -Helix wird über Wasserstoffbrückenbindungen aufgebaut, sodass es hier möglicherweise zu Interferenzen kommt. Interessant ist, dass für ähnliche Glycosylierungsgrade auch ähnliche Helizitäten erhalten werden (Abb. 5-5 (I)-(V)) - unabhängig davon ob Monosaccharide (I), Disaccharide (II, III, IV) oder Trisaccharide (V) an die Polyglutaminsäure angebunden wurden. Dies spricht dafür, dass vor allem die Hydroxylgruppen der Zucker, die sich nah am Polypeptidrückgrat befinden, für die Destabilisierung der  $\alpha$ -Helix verantwortlich sind und Zuckereinheiten mit größerem Abstand zum Rückgrat wenig bis keinen Einfluss auf die Helizität haben. Da alle getesteten Zucker über eine Glucose-Einheit an das Polyglutaminsäure-Rückgrat angebunden sind, ist die unmittelbare Umgebung des Rückgrats in allen getesteten Glycopolyeptiden gleich, weshalb es

nicht weiter überraschend ist, dass für ähnliche Glycosylierungsgrade auch ähnliche Helizitäten erhalten werden.

Um auszuschließen, dass die ähnlichen Helizitäten darauf beruhen, dass die Di- und Trisaccharide im sauren pH-Bereich zum Monosaccharid gespalten wurden, wurden Stabilitätstest mit den Glycopolyeptide bei pH 2.5 durchgeführt. Hierfür wurde PGA-Lactose in destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 M HCl-Lösung auf pH 2.5 gebracht. Das Glycopolyeptid wurde daraufhin für fünf Stunden<sup>7</sup> bei Raumtemperatur gerührt und anschließend dialysiert. Über <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie wurden dann die Glycosylierungsgrade vor und nach der Behandlung mit HCl-Lösung verglichen (s. Anhang 19). Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Substitutionsgrad der Glycopolyeptide festgestellt werden. Eine Spaltung der Zucker zum Monosaccharid kann daher ausgeschlossen werden.

---

<sup>7</sup> Zwei Stunden länger als die maximale Dauer bis zur CD-Spektroskopie Messung

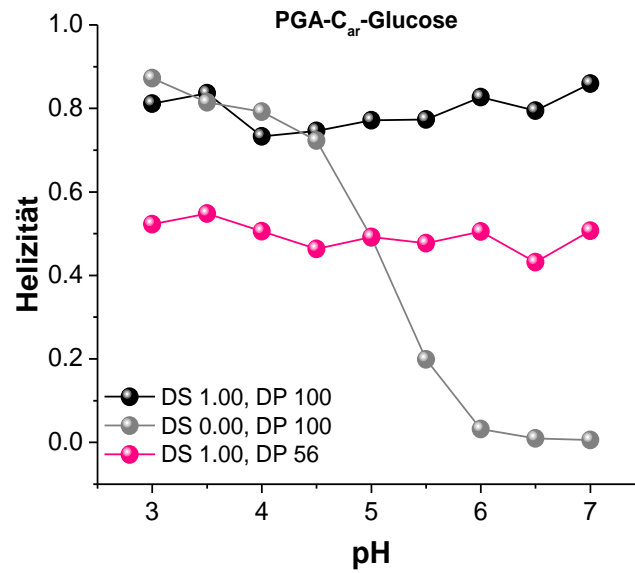
**(I) PGA-Glucose (DP 62):**

**(II) PGA-Maltobiose (DP 56):**

**(III) PGA-Lactose (DP 54):**

**(IV) PGA-Cellobiose (DP 60):**

**(V) PGA-Maltotriose (DP 54):**

**(VI) PGA-Car-Glucose (DP 56)**


**Abb. 5-5 Mittels CD-Spektroskopie bestimmte pH-Abhängigkeit der Helizität für verschiedene Glycopolypeptide (I-VI) mit unterschiedlichen Glycosylierungsgraden**

Anders sieht es aus, wenn hydrophobe Spacer zwischen Zucker und Polypeptidrückgrat (DP 56) eingebracht werden (Abb. 4-5 (VI)). Für niedrige Substitutionsgrade (bis ca. 40 %) zeigen sich ähnlich, wie für die Glycopolyptide (I) bis (V), eine Abnahme der Helizität und eine Verschiebung des Helix-Knäul-Übergangs zu saureren pH-Werten. Bei höheren Substitutionsgraden liegen diese Glycopolyptide jedoch bereits bei neutralem pH-Wert teilweise helikal vor. Bei einem Substitutionsgrad von 76 % wird bereits bei pH 7 eine Helizität von ca. 33 % erhalten, während Glycopolyptide ohne aromatischen Spacer oder mit niedrigerem Substitutionsgrad bei pH 7 keinerlei Helizität aufweisen. Allerdings ist hier auch kein ausgeprägter Helix-Knäul-Übergang zu beobachten. Die Helizität nimmt bei Reduzierung des pH-Werts auf pH 3 nur geringfügig zu und liegt bei etwa 50 %. Für noch höhere Substitutionsgrade wird gar kein Übergang mehr beobachtet. Die Helizität liegt dann über den kompletten pH-Bereich bei ca. 50 %. Sehr wahrscheinlich liegt dies daran, dass es zwischen den Seitenketten zu einem  $\pi$ -Stacking der aromatischen Ringe kommt, wodurch die Helix stabilisiert werden kann und schon bei pH 7 helikale Strukturen im Polypeptide ausgebildet werden können. Da jedoch nur maximale Helizitäten von ca. 50 % erreicht werden können, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen relativ ungeordneten, zufälligen Prozess handelt und das Polypeptid in seinem „Ordnungsprozess“ zu einer kompletten  $\alpha$ -Helix durch das  $\pi$ -Stacking behindert wird.

Betrachtet man Polypeptide mit einem höheren Polymerisationsgrad (DP 100) wird die Ausbildung helikaler Strukturen durch die Anbindung des aromatischen Spacers (Glucose-Car-NH<sub>2</sub>) deutlich verstärkt (vgl. Abb. 5-6). Wie bei dem kurzkettigen Glycopolyptid ist auch für das längere Peptidrückgrat kein Helix-Knäul-Übergang zu beobachten. Die Helizität für PGA-Car-Glucose (DS 1.00) für einen Polymerisationsgrad von DP = 100 liegt ca. 30 % höher als für das Peptidrückgrat mit 56 Wiederholungseinheiten bei gleichem Substitutionsgrad. Die Helizität liegt damit bei etwa 80 % über den kompletten getesteten pH-Bereich. Dies entspricht ungefähr der maximalen Helizität der nicht funktionalisierten PGA-Na (graue Kurve in Abb. 5-6) bei pH 3. Für eine hohe Helizität scheint daher nicht nur die Wahl der Seitenketten von Bedeutung zu sein, sondern auch eine Mindestlänge des Peptidrückgrats erforderlich zu sein.





**Abb. 5-6 pH-Abhängigkeit der Helizität von PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose (DS 1.00) für verschiedene Polymerisationsgrade - DP 100 (schwarz), DP 56 (pink) und Referenz unsubstituierte PGA-Na DP 100 (grau)**

## 6 Lektin Wechselwirkungen

### 6.1 Quantitative Präzipitation

Für erste Bindungsstudien zwischen den hergestellten Glycopolyeptiden und Lektinen wurden Fällungstests gewählt, da diese ohne größeren Aufwand schnell Informationen liefern. Sowohl die Lektine als auch die hergestellten Glycopolyeptide verfügen über mehrere Bindungsstellen. Im Falle einer Interaktion kann es passieren, dass mehrere Lektine an dasselbe Glycopolyeptid binden (Lektin-Clustering) und/oder Quervernetzungen zwischen mehreren Lektinen und Glycopolyeptiden auftreten. In beiden Fällen kann die Löslichkeit der Lektin-Glycopolyeptid-Komplexe soweit herabgesetzt werden, dass es zur Ausbildung eines Präzipitats und somit zu einer Trübung der Lösung kommt. Für erste Abschätzungen der Wechselwirkungen können so beispielsweise zeitabhängige Trübungsmessungen mittels UV-Vis-Spektroskopie durchgeführt werden.<sup>[132]</sup> Genauere Informationen liefern quantitative Fällungstests, bei denen bestimmt wird wieviel Lektin durch das Glycopolyeptid ausgefällt wird.<sup>[132–134]</sup> Durch die Menge an Glycopolyeptid, die benötigt wird, um eine definierte Menge an Lektin auszufällen, kann so die Interaktion von verschiedenen Glycopolyeptiden verglichen werden.

Da alle in dieser Arbeit hergestellten Glycopolyeptide auf Glucose basieren, wurde als Modell-Lektin für die Bindungsstudien Concanavalin A gewählt. Concanavalin A ist ein pflanzliches Lektin aus der Jackbohne (*canavalia ensiformis*), das spezifisch endständige  $\alpha$ -D-Mannose- und  $\alpha$ -D-Glucose-Reste binden kann. Bei pH 7 liegt es als Tetramer vor mit jeweils einer Kohlenhydratbindungsstelle (CRD - *carbohydrate recognition domain*) pro Untereinheit. In jeder Untereinheit befinden sich gebundene  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen, die zwar nicht an der Kohlenhydratbindung beteiligt, aber wichtig für die Sekundärstruktur des Lektins sind. Bei Verlust der Metallionen verändert sich die Position der Aminosäuren, die für die Bindung der Zucker erforderlich sind. Es wurden daher zunächst Fällungstest in verschiedenen Puffern mit und ohne Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen durchgeführt, um zu prüfen, in wieweit der verwendete Puffer die Interaktion mit den Glycopolyeptiden beeinflusst. Hierfür wurde eine mit Mannose funktionalisierte Polyglutaminsäure (DP 50, DS 0.67) verwendet, da die Interaktion von Concanavalin A mit Mannose stärker ist, als mit Glucose. Es wurden jeweils 250  $\mu\text{L}$  der ConA-Lösung (1 mg/mL) in Puffer vorgelegt und 75-150  $\mu\text{L}$  der PGA-Man Lösung

(1 mg/mL) in demselben Puffer zugegeben und beobachtet, wann eine Fällung auftritt. Eine Übersicht der Ergebnisse findet sich in Tabelle 6-1.

**Tabelle 6-1 Einfluss verschiedener Puffer auf die Wechselwirkung von Glycopolypeptiden mit Concanavalin A**

Concanavalin A in...	PGA-Man	Fällung
<b>Phosphatpuffer pH 7.2</b>	Ja	Nach 2h deutliche Fällung
	Nein	keine Fällung nach > 4h
<b>HBS-Puffer pH 7.4</b>	Ja	Fällung nach 30 min
10 mM HEPES, 150 mM NaCl	Nein	Keine Fällung nach > 4h
<b>HBS-Puffer pH 7.4 mit Ca<sup>2+</sup>- und Mn<sup>2+</sup>-Zusatz</b>	Ja	sofort deutliche Fällung
10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 1 mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 1 mM CaCl <sub>2</sub>	Nein	Keine Fällung nach > 4h

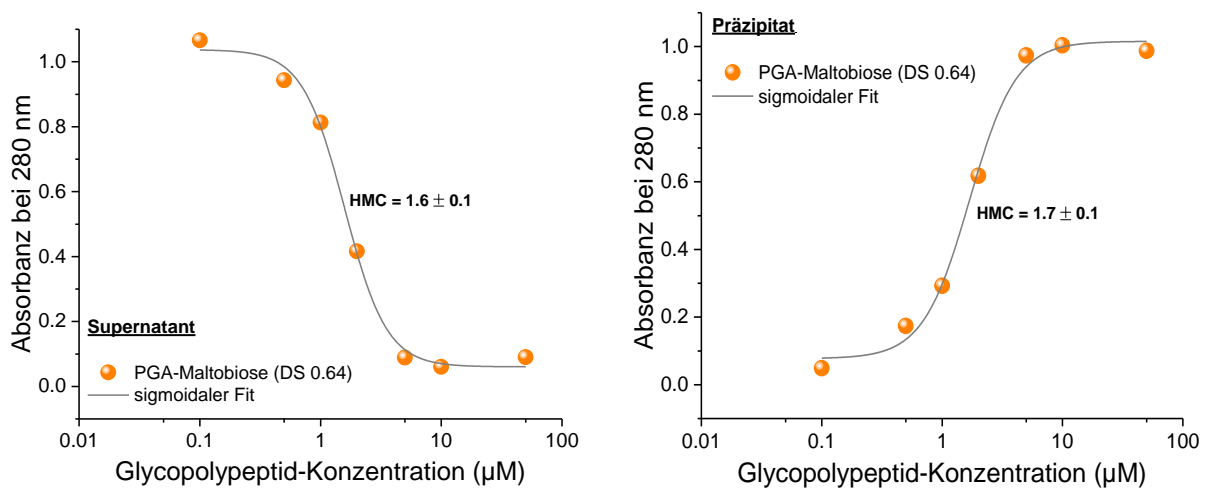
Wird keine PGA-Mannose zu den ConA-Lösungen gegeben, tritt, unabhängig davon welcher Puffer verwendet wurde, auch nach mehr als 4 Stunden kein Präzipitat auf. Das ConA scheint daher in allen drei getesteten Puffern für mehrere Stunden stabil zu sein, sodass die beobachteten Präzipitate bei Zugabe von PGA-Mannose auf die spezifische Zucker-Lektin-Wechselwirkung zurückzuführen sind. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass die Präzipitatabildung bei Zugabe von 100 mM Mannose-Lösung reversibel ist. Vergleicht man den Präzipitationsprozess in den verschiedenen Puffern fällt auf, dass die Präzipitatabildung in Phosphatpuffer mit zwei Stunden deutlich länger dauert, als in HBS Puffer (30 min). Die Zugabe von geringen Mengen Ca<sup>2+</sup>- und Mn<sup>2+</sup>-Ionen beschleunigt den Präzipitationsprozess deutlich, sodass man sofort einen Niederschlag beobachten kann. Für sämtliche Versuche, die Lektinwechselwirkungen betreffen, wurde daher HBS-Puffer mit Zusatz von Ca<sup>2+</sup>- und Mn<sup>2+</sup>-Ionen verwendet.

Für die quantitativen Fällungstests wurde eine Vorgehensweise von KHAN et al. modifiziert und den hergestellten Glycopolypeptiden angepasst.<sup>[133]</sup> Für eine Fällungsreihe wurden jeweils sieben verschiedenen Konzentrationen des zu untersuchenden Glycopolypeptids mit Concanavalin A zum Präzipitieren gebracht. Das Präzipitat wurde daraufhin abzentrifugiert, mit Puffer gewaschen und in 100 mM  $\alpha$ -D-Mannose oder  $\alpha$ -D-Maltobiose Lösung gelöst.

Mittels UV-Vis-Spektroskopie wurde dann der Anteil an Concanavalin A im Überstand und im Präzipitat bestimmt. Hierfür wurde im Vorfeld eine Kalibrierung mit verschiedenen ConA-Konzentrationen in HBS-Puffer pH 7.4 durchgeführt (s. Anhang 37) und die Absorbanz bei 280 nm gemessen. Bei 280 nm absorbieren die Aminosäuren Tryptophan, Thyrosin und Cystein (Disulfid-Bindungen) je nach Anteil im Protein.<sup>[135]</sup> Absorbiert der Bindungspartner (in diesem Fall das Glycopolypeptid) bei 280 nm kein UV-Licht, kann aus der Absorbanz bei 280 nm, nach vorheriger Kalibrierung, der Anteil an Concanavalin A in der Probe bestimmt werden.

### 6.1.1 Quantitative Präzipitation am Beispiel von PGA-Maltobiose

In Abb. 6-1 ist beispielhaft eine Messreihe für PGA-Maltobiose (DS 0.64, DP 56) mit Concanavalin A (10  $\mu\text{M}$ ) gezeigt. Es ist jeweils die Absorbanz bei 280 nm für den Überstand (Supernatant, links) und das gelöste Präzipitat (rechts) gegen die Glycopolypeptid-Konzentration aufgetragen worden.



**Abb. 6-1** Quantitative Präzipitation von PGA-Maltobiose (DS 0.64, DP 56) mit Concanavalin A (10  $\mu\text{M}$ ) in HBS-Puffer pH 7.4 - links: Supernatant, rechts: Präzipitat

Liegt wenig Glycopolypeptid in der Reaktionsmischung vor, kann auch nur wenig Concanavalin A ausgefällt werden. Das bedeutet, dass sich bei niedriger Glycopolypeptid-Konzentration der Großteil des eingesetzten ConA's im Supernatant befindet und nur relativ wenig ConA im Präzipitat zu finden ist. Dies spiegelt sich in den niedrigen Absorbanzen im Präzipitat bzw. den hohen Absorbanzen im Supernatant wieder. Je höher die eingesetzte Glycopolypeptid-Konzentration wird, desto mehr Concanavalin A kann aus der Lösung ausgefällt werden. Dies

zeigt sich in den sinkenden Absorbanzen im Supernatant und den steigenden Absorbanzen im Präzipitat. Werden nun wie in Abb. 6-1 gezeigt die Absorbanzen des ConA's im Supernatant und im Präzipitat bei verschiedenen Glycopolypeptid-Konzentrationen gemessen, erhält man bei logarithmischer Auftragung einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Aus der Lage des Wendepunkts lässt sich die „half maximum concentration“ (HMC) bestimmen. Sie entspricht der Konzentration an Glycopolypeptid, die benötigt wird, um die Hälfte des eingesetzten ConA's auszufällen. Durch die Lage des Wendepunkts ist es so möglich, verschiedenen Glycopolypeptide untereinander zu vergleichen. Je weiter links die Kurve liegt ( $\equiv$  niedrigere Konzentration an Glycopolypeptid), desto besser ist die Interaktion. Theoretisch wäre es ausreichend, entweder den Überstand oder das Präzipitat zu messen. Indem beides bestimmt wird, hat man eine zusätzliche Kontrolle der Ergebnisse, da beide Messungen dieselbe HMC ergeben sollten und die Summe der ConA-Konzentrationen aus Supernatant und Präzipitat der eingesetzten ConA-Konzentration entsprechen muss. Dies ist wichtig, da es vor allem beim Präzipitat durch das notwendige Waschen mit Puffer auch zu Verlusten kommen kann, die die Ergebnisse verfälschen würden. Im Falle der in Abb. 6-1 gezeigten PGA-Maltobiose (DS 0.64, DP 56) ergibt sich sowohl aus der Messung des Supernatants als auch aus der Messung des Präzipitats eine HMC von ungefähr 1.7  $\mu\text{M}$ . Das bedeutet, dass mit 1.7  $\mu\text{M}$  Glycopolypeptid 5  $\mu\text{M}$  Concanavalin A ausgefällt werden können. Dies entspricht im Durchschnitt etwa 3 ConA Molekülen je Glycopolypeptid-Kette.

### 6.1.2 Quantitative Präzipitation mit PGA-Glucose (DS 0.79, DP 62)

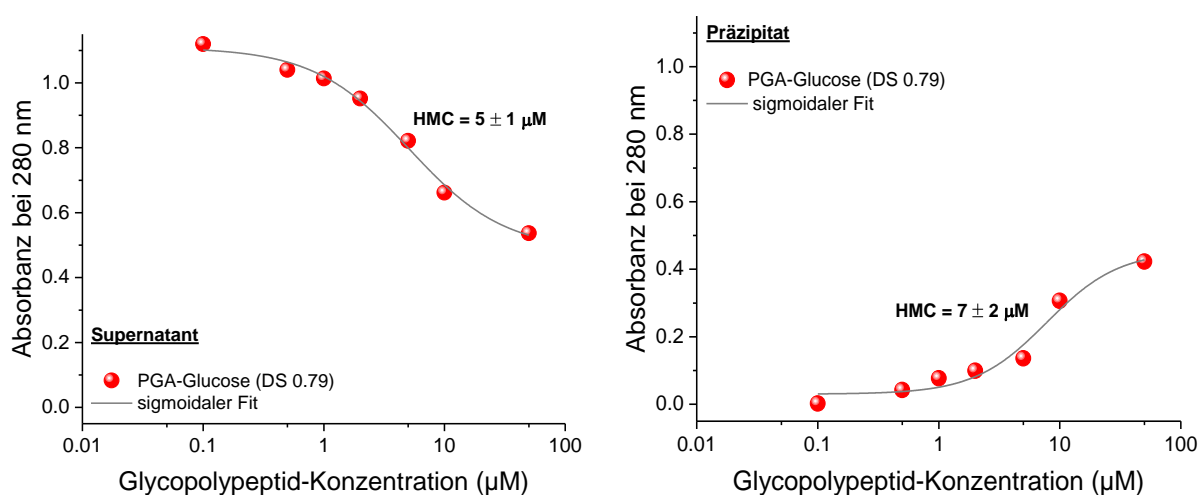
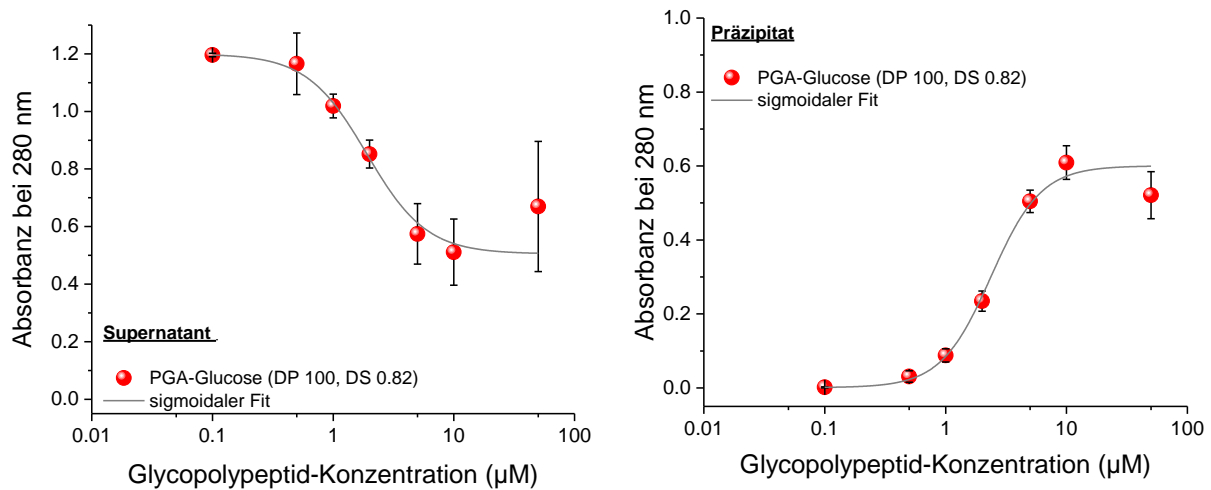


Abb. 6-2 Quantitative Präzipitation von PGA-Glucose (DS 0.79, DP 62) mit Concanavalin A (10  $\mu\text{M}$ ) in HBS-Puffer pH 7.4 - links: Supernatant, rechts: Präzipitat

Analog zu den quantitativen Fällungstests der PGA-Maltobiose wurden auch Fällungstests für die übrigen hergestellten Glycopolypeptide durchgeführt. Interessant waren hierbei vor allem die Ergebnisse für PGA-Glucose (vgl. Abb. 6-2). Anders als bei der PGA-Maltobiose war es hier nicht möglich das Concanavalin A komplett auszufällen. Auch für hohe Glycopolypeptid-Konzentrationen (50  $\mu\text{M}$ ) wird eine Rest-Absorbanz von ca. 0.5 gemessen. Vergleicht man dies mit der Kalibrierung (s. Anhang 37), kann davon ausgegangen werden, dass nur rund die Hälfte des eingesetzten Concanavalin A's ausgefällt wurde. Hierdurch ist auch der Wendepunkt in der sigmoidalen Auftragung weniger stark ausgeprägt, als es bei der PGA-Maltobiose der Fall war. Dadurch dass es nicht zu einer kompletten Fällung des Concanavalin A's gekommen ist, entspricht die HMC nicht, wie im vorherigen Beispiel, der Hälfte der eingesetzten ConA Menge sondern lediglich der Hälfte der ausfällbaren ConA Menge. In diesem Fall wurde am Wendepunkt also nur etwa  $\frac{1}{4}$  des vorgelegten ConA's ( $\approx 2.5 \mu\text{M}$ ) ausgefällt. Dies entspricht nur etwa 0.4 ConA Molekülen je Glycopolypeptid. Damit ist weniger als jede zweite Polymerkette an der Interaktion beteiligt. Eine Steigerung der Glycopolypeptid-Konzentration führte zu keiner Steigerung der Präzipitatmenge. Im Gegenteil, erhöht man die Glycopolypeptid-Konzentration ( $>100 \mu\text{M}$ ), geht das Präzipitat in Lösung und der Anteil an ConA im Überstand nimmt wieder zu. Anscheinend ist die Interaktion mit PGA-Glucose (DS 0.79) deutlich schwächer als mit PGA-Maltobiose (DS 0.64), sodass es zu weniger Quervernetzungen und somit weniger Präzipitat kommt. Eine weitere Steigerung der Glycopolypeptid-Konzentration reduziert die Menge an Quervernetzungen wieder, da es zu einem noch größerem „Überangebot“ an Bindungspartnern kommt und Quervernetzungen unwahrscheinlicher werden.

Vergrößert man die Länge des Polypeptidrückgrats von 62 auf 100 Wiederholungseinheiten bleiben ähnliche Trends erhalten (vgl. Abb. 6-3). Auch bei höheren Polymerisationsgraden ist es nicht möglich das ConA komplett auszufällen. Es wird jedoch verglichen mit der kurzkettigen PGA-Glucose etwas mehr ConA ausgefällt. Außerdem ist der Wendepunkt ausgeprägter und zu niedrigeren Polypeptidkonzentrationen verschoben. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da durch eine Verlängerung des Peptidrückgrats bei gleichem Substitutionsgrad mehr Glucose-Reste pro Glycopolypeptid-Kette präsentiert werden und somit die Zahl der möglichen Bindungspartner innerhalb einer Kette höher ist und mehr Quervernetzungen auftreten können.

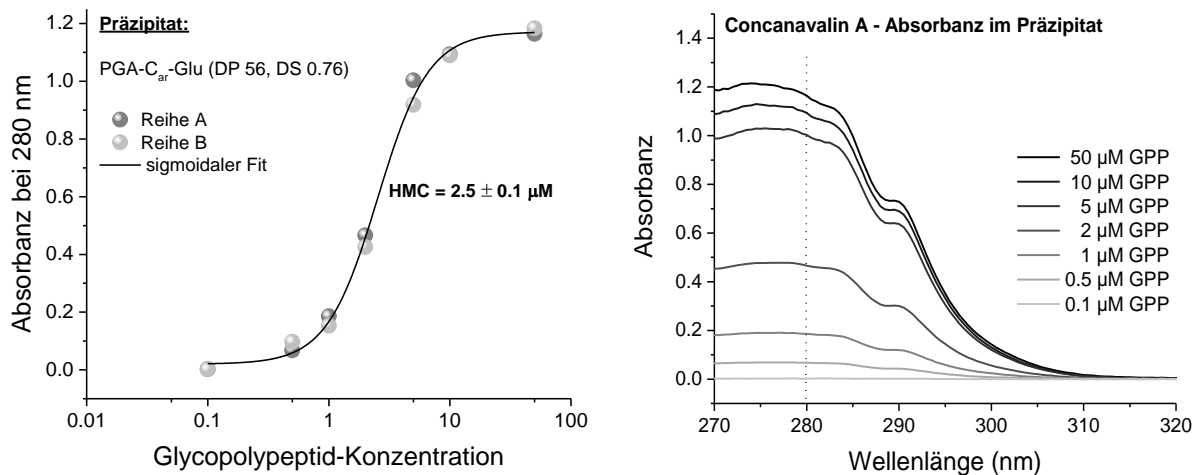


**Abb. 6-3** Quantitative Präzipitation von PGA-Glucose (DS 0.82, DP 100) mit Concanavalin A (10 µM) in HBS-Puffer pH 7.4 - links: Supernatant, rechts: Präzipitat

### 6.1.3 Quantitative Präzipitation mit PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose

Um zu überprüfen, ob die schwächere Interaktion der PGA-Glucose dadurch begründet ist, dass der Zucker durch die unmittelbare Nähe zum Peptidrückgrat schlechter zugänglich ist, wurde eine PGA mit einem aromatischen Spacer hergestellt, der endständig Glucose trägt (PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose, vgl. Kapitel 4.4.3). In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität der Seitenketten nicht nur die Ausbildung von Sekundärstrukturen in wässrigen Lösungen sondern auch die Interaktion mit Lektinen begünstigt.<sup>[31, 93, 123]</sup> Dies wurde durch quantitative Fällungstests mit einer PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose (DP 56, DS 0.76) überprüft. Da der Spacer einen aromatischen Ring enthält, ist dieser selbst auch UV-aktiv und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 240 nm. Bei höheren Glycopolypeptid-Konzentrationen und vor allem bei hohen Substitutionsgraden beginnt der durch den Spacer verursachte Basislinienanstieg bereits im Bereich von 280 nm, wo sonst das ConA nachgewiesen wird. In den Versuchen werden maximal 50 µM Glycopolypeptid eingesetzt. Bei einem Polymerisationsgrad von ca. 60 Wiederholungseinheiten und einem Substitutionsgrad von 80 % entspricht das 2400 µM der aromatischen Seitenkette. Das ist die 240-fache Konzentration verglichen mit dem eingesetzten Lektin. Ein genauer Nachweis des ConAs neben hohen Konzentrationen des Glycopolypeptids ist somit nicht möglich. Im Falle der PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose wurde daher nur das Präzipitat für die Auswertung herangezogen, da hier die Glycopolypeptid-Konzentration sehr viel geringer ist. Überschüssiges Glycopolypeptid wird bei

den Waschschritten des Präzipitats entfernt. Es sind lediglich die Glycopolypeptidketten in der Probe enthalten, die an der Interaktion mit dem ConA beteiligt sind.



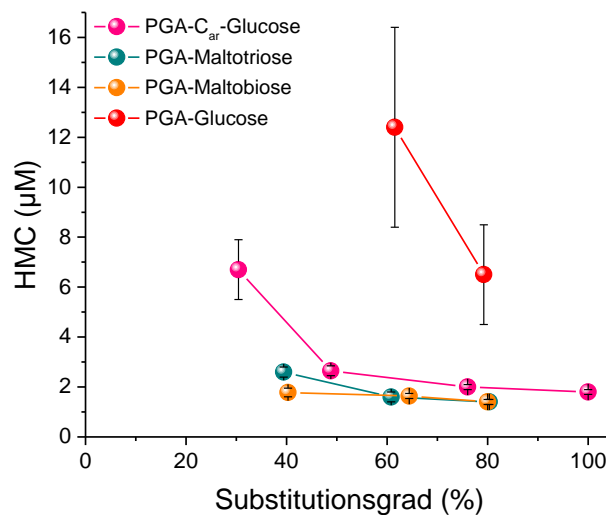
**Abb. 6-4 Quantitative Präzipitation von PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose (DP 56, DS 0.76)**  
links: sigmoidale Auftragung zweier unabhängiger Präzipitat Messreihen A+B; rechts: Absorbanz der Messreihe A über einen Wellenlängenbereich von 270-320 nm

In Abb. 6-4 ist rechts die Absorbanz der gemessenen Proben über den Wellenlängenbereich von 270-320 nm gezeigt. Vergleicht man die gezeigten UV/Vis-Spektren mit den UV/Vis-Spektren reiner Concanavalin A Lösungen (s. Anhang 38), sieht man, dass keine störenden Absorbanzen, die auf die Seitenkette schließen lassen, in den Präzipitatproben beobachtet werden. Die gemessenen Absorbanzen sind allein auf das Concanavalin A im Präzipitat zurückzuführen. Stellt man nun die sigmoidalen Auftragungen der PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose (Abb. 6-4, links) und der PGA-Glucose (Abb. 6-2) mit vergleichbaren Substitutions- und Polymerisationsgraden gegenüber, sieht man, dass durch die Verwendung des Spacers die Interaktion mit dem Concanavalin A verbessert werden konnte. Durch den Einsatz des Spacers wird eine vollständige Präzipitation des ConA's erreicht, wie es auch bei der PGA-Maltobiose (vgl. Abb. 6-1) der Fall war, und die Lage des Wendepunktes verschiebt sich zu niedrigeren Glycopolypeptid-Konzentrationen. Die HMC für PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose (DP 56, DS 0.76) beträgt  $2.5 \pm 0.1 \mu$ M. Dies entspricht etwa 2 ConA Molekülen je Glycopolypeptid, was geringfügig weniger ist, verglichen mit der PGA-Maltobiose (DP 56, DS 0.64).



#### 6.1.4 Vergleich der hergestellten Glycopolypeptide

Für einen umfassenden Vergleich der unterschiedlichen Glycopolypeptide wurden quantitative Fällungstests für PGA-Glucose, -Maltobiose, -Maltotriose und -C<sub>ar</sub>-Glucose mit verschiedenen Substitutionsgraden durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden für den Vergleich die HMCs herangezogen und nicht die sigmoidalen Auftragungen. In Abb. 6-5 sind die jeweiligen HMCs gegen den Substitutionsgrad aufgetragen. Es handelt sich um kurzkettige Glycopolypeptide mit einem Polymerisationsgrad im Bereich von DP 49 – 62.



**Abb. 6-5 Einfluss des Substitutionsgrades auf die Wechselwirkung mit Concanavalin A für verschiedene Glycopolypeptide (DP 49-62)**

Betrachtet man Abb. 6-5 fällt auf, dass die schwächsten Interaktionen für PGA-Glucose erhalten werden. Nur für Substitutionsgrade  $\geq 60$  bildet sich überhaupt ein Präzipitat mit Concanavalin A, das jedoch keiner vollständigen Fällung des ConA's aus der Lösung entspricht. Die HMCs der getesteten PGA-Glucosen liegen deutlich höher, als die aller anderen untersuchten Glycopolypeptide. Es werden also sehr viel höhere Konzentrationen des Glycopolypeptids benötigt, um Concanavalin A auszufällen. Wird der Zuckerrest am Polypeptidrückgrat um eine Glucoseeinheit vergrößert (PGA-Maltobiose), zeigt sich eine eindeutige Verbesserung in der Wechselwirkung mit dem ConA. Es werden deutlich niedrigere Konzentrationen an Glycopolypeptid benötigt, um das Concanavalin A auszufällen. Außerdem bildet sich auch bei niedrigeren Substitutionsgraden von  $\geq 40\%$  noch ein Präzipitat. Eine weitere Vergrößerung des Zuckerrests um noch eine Glucoseeinheit (PGA-Maltotriose) bringt keine zusätzliche Verbesserung der Wechselwirkung. Es treten keine signifikanten Unterschiede zwischen PGA-Maltobiose und PGA-Maltotriose in der Interaktion mit dem Concanavalin A auf.

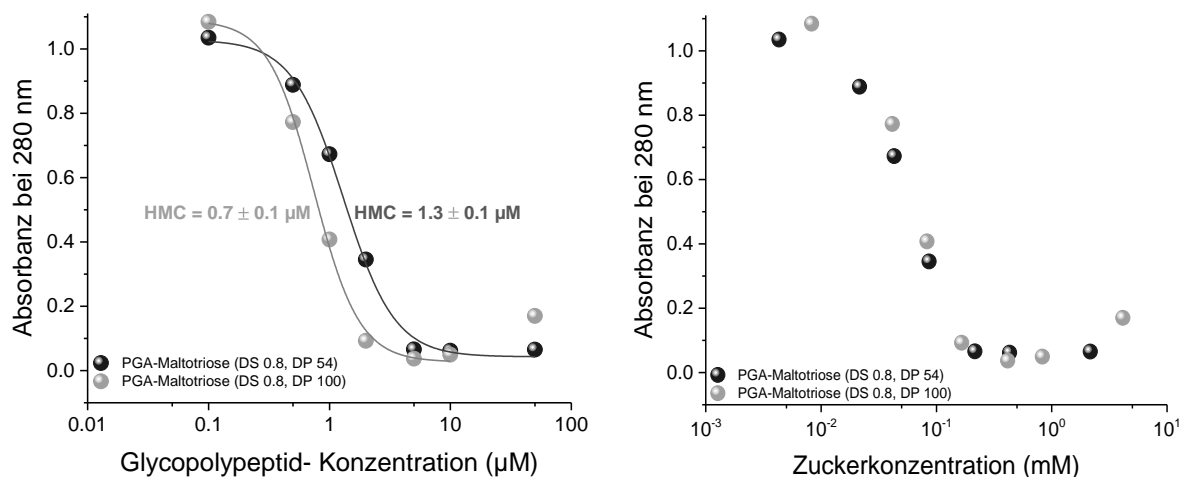
Für ähnliche Substitutionsgrade werden vergleichbare HMCs beobachtet. Sehr wahrscheinlich wird nur der endständige Glucoserest vom Concanavalin A gebunden. Im Falle der PGA-Glucose befindet sich dieser direkt am Peptidrückgrat, was vermutlich zu einer eingeschränkten Zugänglichkeit führt. Im Falle der PGA-Maltobiose und PGA-Maltotriose fungieren die Glucoseeinheiten, die sich direkt am Peptidrückgrat befinden als eine Art hydrophiler Spacer. Sie sind sehr wahrscheinlich nicht direkt an der Lektinbindung beteiligt. Sie sorgen aber dafür, dass die endständigen Glucoseeinheiten einen größeren Abstand vom sterisch anspruchsvollen Polymergerüst haben und somit besser für das Lektin zugänglich sind.

Für die PGA mit dem aromatischen Spacer (PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose) werden ähnliche Ergebnisse wie für die Di- und Trisaccharide erhalten. Insgesamt liegen die HMCs über alle getesteten Substitutionsgrade jedoch etwas höher. Die Interaktion scheint daher etwas schwächer zu sein. Nichtsdestotrotz erfüllt der aromatische Spacer seinen Zweck, da die Interaktion verglichen mit der PGA-Glucose ohne Spacer sehr viel besser ist.

Auffällig ist, dass es anscheinend für jedes Polypeptid einen „Mindestsubstitutionsgrad“ gibt, der für die Ausbildung eines Präzipitats erforderlich ist. Für PGA-Maltobiose, PGA-Maltotriose und PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose liegt dieser Substitutionsgrad zwischen 20-30 % und für PGA-Glucose bei etwa 60 %. Interessant ist, dass eine weitere Erhöhung des Substitutionsgrades über diesen „Mindestsubstitutionsgrad“ hinaus die Interaktion mit dem Concanavalin A nicht signifikant verbessert. So zeigt eine PGA-Maltobiose mit einem Substitutionsgrad von 40 % eine ähnlich gute Interaktion, wie eine PGA-Maltobiose mit einem Substitutionsgrad von 80 %. Sehr wahrscheinlich liegt dies daran, dass nur ein Teil der angebundenen Zucker auch effektiv für Interaktionen zur Verfügung stehen. Der Abstand zwischen zwei Bindungstaschen des Concanavalin A beträgt etwa  $\approx 6.5 \text{ nm}$ .<sup>[136, 137]</sup> Wird ein Zuckerrest vom ConA gebunden, ist es extrem unwahrscheinlich, dass Zuckerreste aus der unmittelbaren Umgebung des ersten Zuckers durch ein weiteres Concanavalin A gebunden werden können. Es scheint daher nur ein gewisser Substitutionsgrad für eine ausreichende Quervernetzung benötigt zu werden. Dementsprechend ist eine komplette Glycosylierung für eine gute Interaktion nicht erforderlich.

### 6.1.5 Einfluss des Polymerisationsgrads

Zusätzlich zu den bisherigen Betrachtungen wird im Folgenden noch der Einfluss des Polymerisationsgrades auf die Interaktion mit dem Concanavalin A anhand der PGA-Maltotriose betrachtet. In Abb. 6-6 ist die sigmoidale Auftragung bezogen auf die Glycopolypeptid-Konzentration (links) und auf die Maltotriose-Konzentration (rechts) für zwei verschiedene Polymerisationsgrade (DP 100 & DP 54) gezeigt. Wird die Glycopolypeptid-Konzentration betrachtet, ist die Kurve für den größeren Polymerisationsgrad (DP 100) zu niedrigeren Polypeptidkonzentrationen verschoben, verglichen mit dem kurzkettigeren Polypeptid. Halbiert man den Polymerisationsgrad verdoppelt sich die HMC. Auf den ersten Blick scheint daher die Interaktion mit dem Polypeptid mit dem höheren Polymerisationsgrad besser zu sein. Allerdings verfügt das größere Polypeptid bei gleichem Substitutionsgrad auch über doppelt so viele Zuckerreste am Rückgrat und somit über doppelt so viele Bindungsstellen. Bezieht man sich anstelle der Glycopolypeptid-Konzentration auf die tatsächliche Konzentration an Zuckern relativiert sich das Bild (Abb. 6-6, rechts). Die sigmoidalen Auftragungen für beide Polypeptide fallen zusammen. Bezogen auf die tatsächliche Zuckerkonzentration, weisen beide Polypeptide ähnlich gute Interaktionen mit dem Lektin auf. Dies ist unabhängig davon, ob wenige lange oder doppelt so viele halb so große Ketten vorliegen.



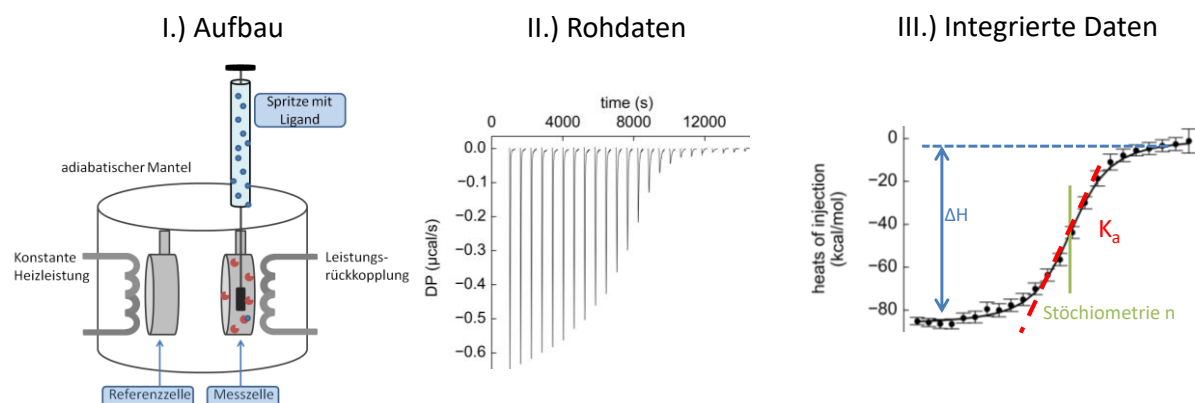
**Abb. 6-6 Einfluss des Polymerisationsgrades auf die Wechselwirkungen mit Concanavalin A am Beispiel von PGA-Maltotriose (DS 0.8) – links: sigmoidale Auftragung auf die Glycopolypeptid-Konzentration bezogen, rechts: sigmoidale Auftragung auf die Zuckerkonzentration bezogen**

## 6.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Isotherme Titrationskalorimetrie ist eine Methode zur Messung intermolekularer Wechselwirkungen, die direkt die Bestimmung der Anzahl der Bindungsstellen  $n$ , der Bindungsenthalpie  $\Delta H$  und der Assoziationskonstante  $K_a$  ermöglicht. Der wesentliche Aufbau ist in Abb. 6-7 - I). gezeigt und besteht aus zwei adiabatisch abgeschirmte Zellen – einer Referenzzelle und einer Messzelle, sowie einer Spritze. In der Messzelle wird ein Bindungspartner vorgelegt (bspw. Concanavalin A), der entsprechende Ligand (Zucker oder Glycopolypeptid) wird in definierten Mengen über die Spritze zutitriert. Für jede Injektion stellt sich ein Gleichgewicht zwischen freien und gebundenen Bindungspartnern ein (6-1):

$$K_a = \frac{1}{K_d} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (6-1)$$

Kommt es zu einer Interaktion, wird entweder Wärme aufgenommen (endotherm) oder Wärme abgegeben (exotherm). Die Heizleistung der Messzelle wird entsprechend angepasst, sodass Mess- und Referenzzelle während des kompletten Experiments dieselbe Temperatur haben. Über den Unterschied der Heizleistung zwischen Referenz und Messzelle ist so die aufgenommene oder abgegebene Wärmemenge für jede Injektion zugänglich. Es werden nach und nach mehrere Injektionen gemacht, wobei der Bindungspartner in der Messzelle zunehmend mit Ligand gesättigt wird und entsprechend mit jeder weiteren Injektion weniger Wärme freigesetzt wird (Abb. 6-7 - II). Aus den Wärmemenge der einzelnen Injektionen (Integration der Peakflächen) und den Verhältnissen von Ligand zu Bindungspartner sind dann die thermodynamischen Parameter durch eine graphische Auftragung (Wiseman-Plot) zugänglich (Abb. 6-7 - III.).<sup>[138]</sup>



**Abb. 6-7 I) Aufbau einer ITC-Messung, II) Rohdaten – Messung d. benötigten Heizleistung gegen die Zeit, III.) Integration der Peaks aus den Rohdaten aufgetragen gegen die molaren Verhältnisse der Bindungspartner liefert  $\Delta H$ ,  $K_a$  und die Stöchiometrie  $n$**

Da die Temperatur während des kompletten Experiments konstant ist, lässt sich mit Hilfe der idealen Gaskonstante  $R$  über die Assoziationskonstante  $K_a$  die Gibbs-Energie  $\Delta G$  berechnen:

$$\Delta G = - RT \cdot \ln(K_a) \quad (6-2)$$

Die Gibbs-Energie setzt sich aus einem Term für die Enthalpie und einem Term für die Entropie zusammen, sodass über die berechnete Gibbs-Energie und die gemessene Reaktionsenthalpie auch die Entropie der Reaktion berechnet werden kann.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6-3)$$

Alle wichtigen thermodynamischen Parameter einer Interaktion sind so über nur ein einziges Experiment zugänglich. Aus den thermodynamischen Parametern lassen sich darüber hinaus Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus ziehen. Eine spontane Reaktion hat eine negative Gibbs-Energie. Je negativer die Gibbs-Energie, umso stärker die Interaktion. Bei nicht-kovalenten Bindungen, wie im Falle der Lektin-Glycopolypeptid-Interaktion, müssen die beiden Bindungspartner eine größere Affinität zu einander als zum Lösungsmittel haben. In der Regel handelt es sich bei den zugrunde liegenden Anziehungskräften entweder um polare oder hydrophobe Interaktionen. Wie bereits erwähnt setzt sich die Gibbs-Energie aus einem enthalpischen und einem entropischen Term zusammen. Polare Wechselwirkungen wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen tragen im Wesentlichen zum enthalpischen Term bei. Eine negative Enthalpieänderung spricht daher für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die eine Interaktion der Bindungspartner favorisieren. Während entropisch beeinflusste Interaktionen häufig eher hydrophober Natur sind und auf Konformationsänderungen oder der Freisetzung von Wasser beruhen. Bei ähnlicher Gibbs-Energie zweier Interaktionen können so durch Unterschiede in Enthalpie und Entropie (positiv/negativ) Informationen über die Art der Bindung erhalten werden.<sup>[139]</sup>

Ein Maß für die Qualität einer ITC Messung ist der sogenannte C-Wert. Er gibt an wie gut sich eine Messung über einen Wiseman-Plot auswerten lässt. Der C-Wert ist dimensionslos und wird gemäß Gleichung (6-4) ermittelt.

$$C = \frac{[M]}{K_D} \cdot n \quad (6-4)$$

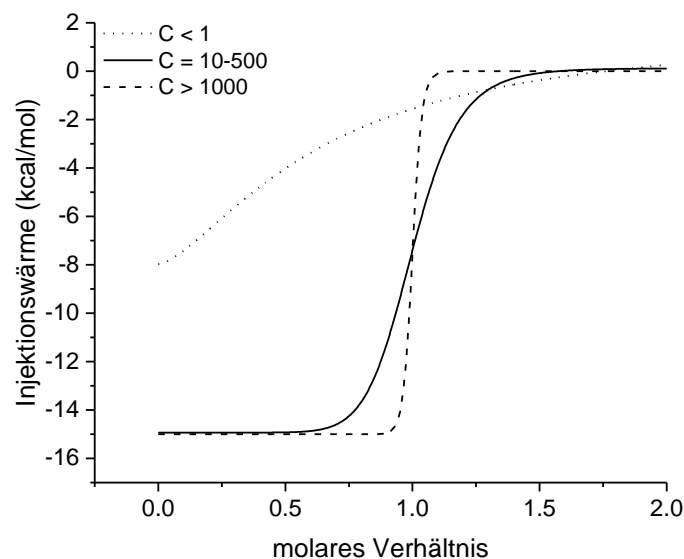
Über den C-Wert lässt sich die Qualität einer Auftragung wie folgt abschätzen:<sup>[138]</sup>

$C = 10-500$  – sehr gute Qualität

$C = 500-1000$  und  $1-10$  – ausreichende Qualität

$C \leq 1$  oder  $> 1000$  – unzureichende Qualität

Prinzipiell beruht diese Einordnung auf der Form des sigmoidalen Fits und der Zugänglichkeit des Wendepunkts. Für sehr große C-Werte wird die Stufe in der sigmoidalen Auftragung so steil, dass zwar noch die Enthalpieänderung  $\Delta H$  als auch die Stöchiometrie  $n$  der Interaktion sehr genau bestimmt werden können. Die Assoziationskonstante  $K_a$ , die über die Steigung am Wendepunkt erhalten wird, kann jedoch nicht mehr präzise bestimmt werden (gestrichelte Linie in Abb. 6-8). Für sehr kleine C-Werte hingegen wird der Wendepunkt immer undefinierter, da die Kurve ihre sigmoidale Form verliert, sodass eine genaue Auswertung der drei Parameter ebenfalls nicht möglich ist (gepunktete Linie in Abb. 6-8). Ideal ist eine ausgeprägte sigmoidale Form mit moderater Steigung am Wendepunkt, wie in der schwarzen Kurve in Abb. 6-8 dargestellt.



**Abb. 6-8 Beispiele für hohe C-Werte (gestrichelt), niedrige C-Werte (gepunktet) und zur Auswertung geeignete C-Werte (durchgezogene Linie) bei einer ITC-Messung**

### 6.2.1 Isotherme Titrationskalorimetrie von Glycopolypeptiden

Im Falle der Glycopolypeptide handelt es sich um multivalente Liganden: An einer Peptidkette sind mehrere Zucker angebunden, die theoretisch alle mit dem verwendeten Concanavalin A interagieren können. Für multivalente Liganden ist es besonders wichtig die funktionelle Valenz zu bestimmen, die nicht zwingend mit der tatsächlichen Zahl an Epitopen (strukturelle Valenz) übereinstimmen muss. Für die Berechnung der funktionellen Valenz wurde nach DAM et al. folgende Beziehung verwendet, wobei  $n$  dem im ITC Experiment bestimmten Wert für die Stöchiometrie entspricht<sup>[140]</sup>:

$$\text{Funktionelle Valenz} = \frac{1}{n} \quad (6-5)$$

Nicht jeder Zucker am Polypeptidrückgrat muss für eine Interaktion mit dem Concanavalin A zur Verfügung stehen. Der minimale Abstand zwischen zwei Zuckern beträgt  $\approx 0.4 \text{ nm}$ , wenn zwei benachbarte Peptidbindungen funktionalisiert sind. Der Abstand zwischen zwei Bindungsstellen des Concanavalin A liegt bei  $\approx 6.5 \text{ nm}$ .<sup>[136, 137]</sup> Das bedeutet, wenn ein Zucker gebunden wurde, ist es unmöglich, dass Zucker in der unmittelbaren Nachbarschaft mit einer zweiten Bindungsstelle desselben Concanavalin A Moleküls wechselwirken können. Außerdem ist es aus sterischen Gründen extrem unwahrscheinlich, dass sie dann noch mit einem weiteren Concanavalin A Molekül interagieren können. Die funktionelle Valenz gibt daher Informationen, wie viele der angebundenen Zucker tatsächlich für Interaktionen zur Verfügung stehen.

Wichtig zu erwähnen ist, dass es im Fall der Glycopolypeptid-Concanavalin A Interaktion bei pH 7.4 zur Bildung eines Präzipitats kommt. Das Concanavalin A liegt bei pH 7.4 als Tetramer vor, verfügt also über 4 Bindungsstellen (Carbohydrate Recognition Domains - CRDs). Die in den ITC Experimenten verwendeten Glycopolypeptide tragen zwischen 20 und 100 Zuckerreste, sodass eine Quervernetzung zwischen den Glycopolypeptidketten und dem Concanavalin A auftreten kann. Wie stark eine Quervernetzung auftritt, hängt dabei von den Verhältnissen der Bindungspartner zueinander ab. Das Entstehen eines Präzipitats kann die Qualität der Ergebnisse beeinflussen, da zusätzliche Störsignale durch die Präzipitatbildung auftreten können. Es sollte daher versucht werden, die Bildung von Präzipitaten, während des Experiments zu reduzieren. DAM et al. empfehlen hierfür (a) die Konzentration von Lektin und Ligand zu reduzieren, (b) bei niedrigen pH-Werten zu messen, da das Lektin dann nicht mehr als Tetramer sondern als Dimer vorliegt oder (c) Puffer mit geringer Salzkonzentration

zu verwenden.<sup>[140]</sup> Bei den durchgeführten ITC Experimenten lag die Concanavalin A Konzentration in der Messzelle bei 50  $\mu\text{M}$  (bezogen auf die Monomereinheit  $\equiv$  12,5  $\mu\text{M}$  Tetramer) und die Konzentration der Glycopolypeptide in der Spritze bei 25-30  $\mu\text{M}$ . Das Volumen der Messzelle beträgt 1,4 mL. Während der Versuche wurden maximal 270  $\mu\text{L}$  Glycopolypeptid zugegeben (27 Injektionen  $\times$  10  $\mu\text{L}$ ). Am Ende des Experiments lag die Glycopolypeptidkonzentration in der Messzelle daher zwischen 3.5-6  $\mu\text{M}$ , was deutlich unterhalb der Konzentration des Concanavalin A liegt. Somit liegt deutlich weniger Glycopolypeptid bei ähnlicher Menge an Concanavalin A vor, verglichen mit den quantitativen Fällungstests (mit viel ConA im Präzipitat) aus Kapitel 6.1, wodurch die Ausbildung von Quervernetzungen reduziert wird. Nichtsdestotrotz konnte eine Präzipitation nicht komplett unterdrückt werden. Die erhaltenen ITC Daten zeigen jedoch eine ungestörte Basislinie, geringe Streuung und eine ausreichende Zahl an Datenpunkten, sodass die Qualität der Daten für eine Auswertung geeignet ist.

Die Konzentration der Bindungspartner hat einen großen Einfluss auf die aus dem Experiment erhaltenen Parameter. Es ist daher sehr wichtig, dass die Konzentrationen korrekt bestimmt wurden. Beim Concanavalin A ist hierbei nicht nur die exakte Einwaage von Bedeutung, sondern auch die Aktivität des Proteins.<sup>[140]</sup> Bei den durchgeführten Versuchen wurde davon ausgegangen, dass das komplette Concanavalin A aktiv ist und für eine Interaktion zur Verfügung steht. Bei Proteinen muss dies aber nicht zwingend der Fall sein. Zur absoluten Bestimmung der thermodynamischen Parameter und zum Vergleich mit anderen Messungen sollte daher die Aktivität des verwendeten Concanavalin A's überprüft werden. Dies wäre zum Beispiel über die Titration gegen einen monovalenten Liganden (Glucose, Mannose) möglich, dessen thermodynamische Parameter für die Interaktion mit Concanavalin A bekannt sind. Der n-Wert für die Stöchiometrie sollte in diesem Falle 1 betragen. Läge der Wert nur bei 0.8, könnte davon ausgegangen werden, dass 20 % des Concanavalin A's inaktiv sind. Das Concanavalin A sollte in diesem Falle solange aufgereinigt werden, bis der n-Wert 1 beträgt. Da hierfür nicht die nötige Ausstattung zur Verfügung stand, wurde auf die Aktivitätsbestimmung mittels ITC und chromatographische Aufreinigung des Concanavalin A's verzichtet. Für alle Versuche wurde aber Concanavalin A derselben Charge verwendet, weshalb die durchgeführten ITC-Messungen untereinander vergleichbar sein sollten. Vergleiche mit Messungen aus anderen Chargen oder der Literatur, sollten aber mit Vorsicht betrachtet wer-



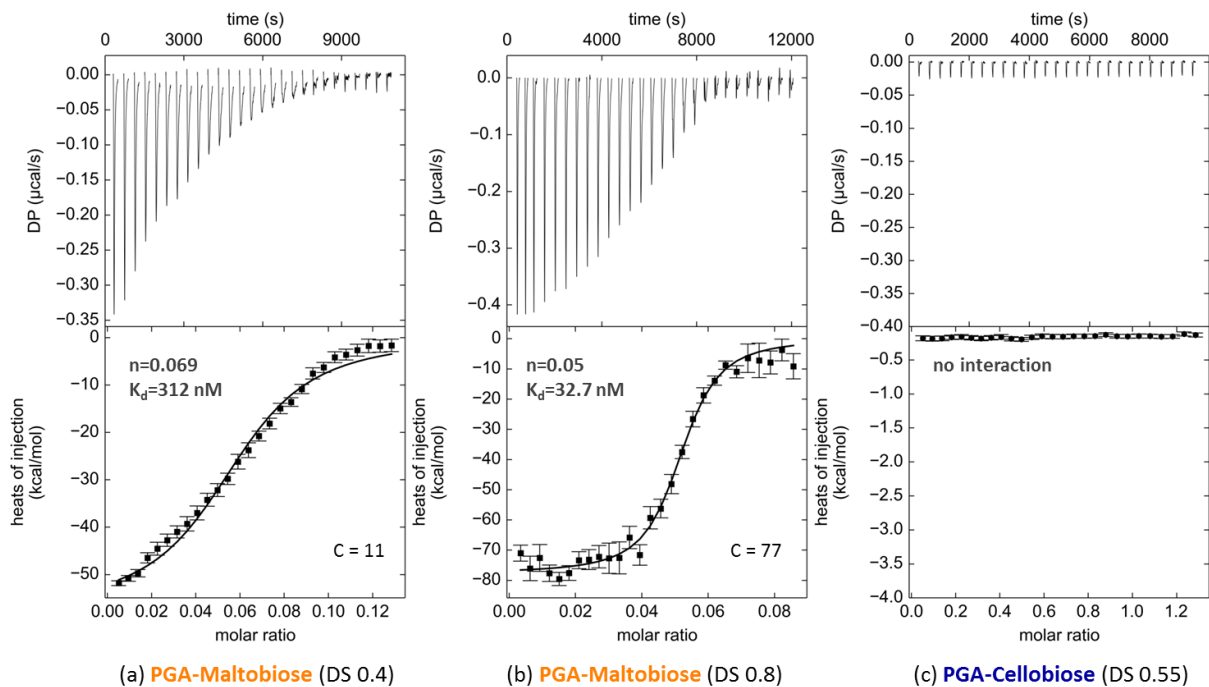
den, da lediglich die Agglutinierungs-Aktivität des verwendeten Concanavalin A's bekannt ist.<sup>8</sup>

Bei den Glycopolyeptiden kann die Konzentration theoretisch sowohl auf die Polypeptidkette als auch auf die Zahl der Epitope bezogen werden. Um die Glycopolyeptide mit unterschiedlichen Substitutionsgraden und Funktionalisierungen untereinander besser vergleichen zu können, wurde sich auf die Glycopolyeptid-Konzentration bezogen und nicht auf einzelne Epitope an der Kette. Da an den Glycopolyeptidketten mehr als ein Zucker angebunden ist, werden für die Stöchiometrien bei dieser Betrachtung n-Werte  $< 1$  erhalten. Über die Berechnung der funktionellen Valenz (6-5) kann dann die Zahl der zur Verfügung stehenden Epitope ermittelt werden.

Um herauszufinden, ob ITC als Methode geeignet ist die Interaktion von Concanavalin A mit den synthetisierten Glycopolyeptiden zu untersuchen, wurde zunächst die Interaktion von kurzkettiger Maltobiose-funktionalisierter PGA-Na (DP 56, DS 0.4 und DS 0.8) getestet. Die Glycopolyeptide wurden aufgrund der Ergebnisse der quantitativen Präzipitationsversuche ausgewählt, da sich hier eine gute Interaktion gezeigt hat. Darüber hinaus ist bei kurzkettigen Glycopolyeptiden eine geringere Quervernetzung zu erwarten, als bei Glycopolyeptiden mit einem hohem Polymerisationsgrad. Wie bereits erwähnt, kann das Auftreten von Präzipitaten die Qualität der ITC Daten stark beeinträchtigen. Eine geringere Quervernetzung ist daher wünschenswert, weil dadurch die Präzipitation reduziert wird. Als Referenzmessung wurde zusätzlich die Interaktion einer mit Cellobiose funktionalisierten PGA-Na getestet (DP 60, DS 0.55). Obwohl Cellobiose, wie Maltobiose, aus zwei Glucose-Einheiten aufgebaut ist, ist Concanavalin A nicht in der Lage Cellobiose zu binden. Cellobiose ist  $\beta$ -1,4-verknüpft, während Maltobiose  $\alpha$ -1,4-verknüpft ist. Der Aufbau der Bindungstasche lässt eine Interaktion mit  $\beta$ -1,4-verknüpften Zuckern nicht zu.<sup>[97, 141]</sup> Für die ITC-Messungen wird daher keine Interaktion erwartet. Die Ergebnisse der Messungen finden sich in Abb. 6-9.

---

<sup>8</sup> Herstellerangabe: Agglutinierungs-Aktivität  $\leq 64 \mu\text{g/mL}$   $\equiv$  niedrigste Konzentration, um eine 2 %-ige Suspension humaner Erythrozyten nach 1h Inkubation bei 25 °C zu agglutinieren

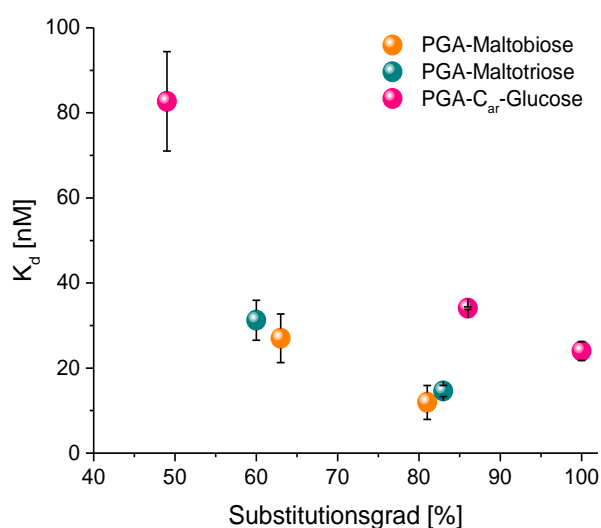


**Abb. 6-9 ITC-Thermogramme von (a) PGA-Maltobiose (DP 56, DS 0.40), (b) PGA-Maltobiose (DP 56, DS 0.80), (c) PGA-Cellobiose (DP 60, DS 0.55)**

Wie erwartet, zeigt sich für PGA-Cellobiose (DP 60, DS 0.55) keine Interaktion mit Concanavalin A. Es sind lediglich minimale Injektionssignale ( $< 0.05 \mu\text{cal/s}$ ) zu sehen, die auf Verdünnungswärme zurückzuführen sind. Solche Signale treten auch bei der Injektion von Glycopolyptid-Lösungen in Puffer auf und haben nichts mit einer Interaktion mit Concanavalin A zu tun. Für beide mit Maltobiose-funktionalisierten PGAs kann hingegen eine Interaktion beobachtet werden. Für einen Glycosylierungsgrad von 40 % wird eine Dissoziationskonstante von 312 nM erhalten, was verglichen mit monovalenter  $\alpha$ -D-Maltobiose<sup>9</sup> eine Verbesserung der Affinität um den Faktor 1000 darstellt.<sup>[142]</sup> Bei einer Verdopplung des Glycosylierungsgrades auf 80 % wird ungefähr eine Verzehnfachung der Affinität ( $K_d = 32.7 \text{ nM}$ ) gegenüber der weniger stark glycosylierten PGA-Na beobachtet. In Bezug auf die monovalenten  $\alpha$ -D-Maltobiose, konnte die Affinität somit, um den Faktor  $10^4$  verbessert werden.<sup>[142]</sup> Sehr wahrscheinlich liegt die Ursache dieser Affinitätssteigerungen an verschiedenen Faktoren, die zu einer Reduzierung der Dissoziationsgeschwindigkeit führen.<sup>[2]</sup> Hierzu zählen: Rezeptor-Clustering, Chelatisierung mehrerer Bindungsstellen und die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für erneutes Binden von benachbarten Zuckern durch die Vielzahl an Zucker-Bausteinen auf dem Glycopolyptidrückgrat.<sup>[104]</sup>

<sup>9</sup>Assoziationskonstante Maltobiose<sup>[142]</sup>:  $K_a = 1.31 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \equiv K_d = 0.76 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

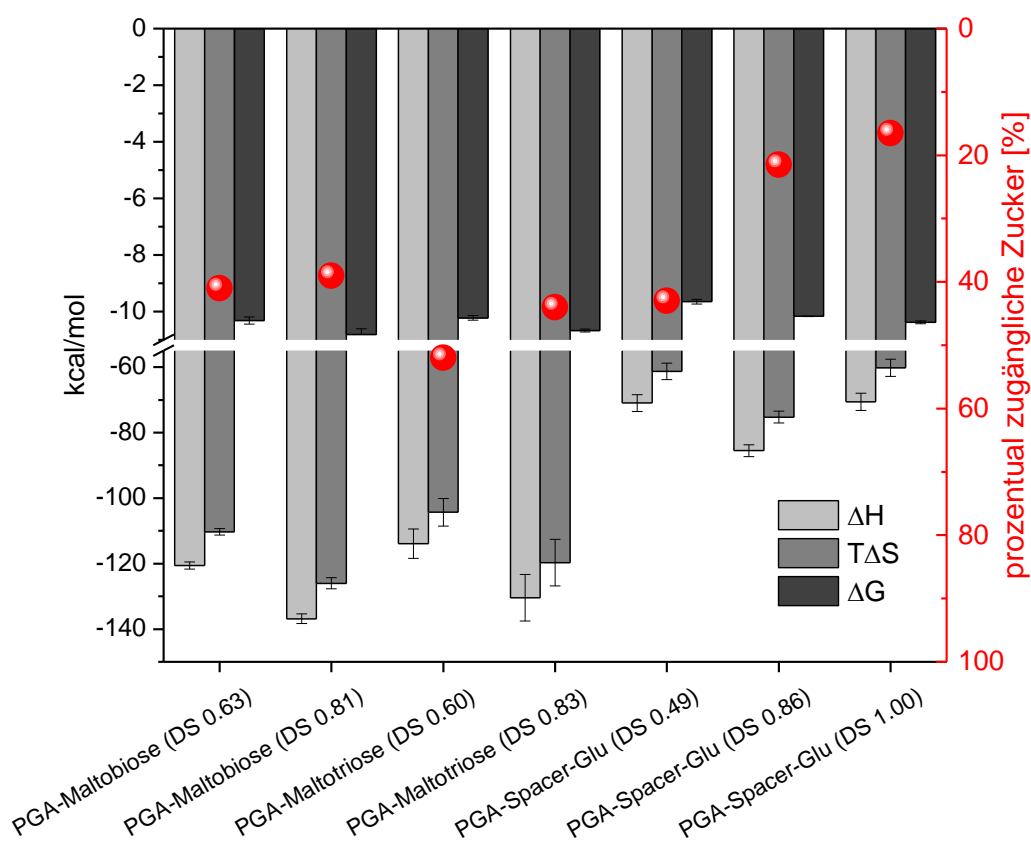
Um den Einfluss der verschiedenen Zucker (Glucose, Maltobiose, Maltotriose) auf die Interaktion mit Concanavalin A zu untersuchen, wurden Glycopolypeptide synthetisiert, die alle auf demselben PGA-Na Gerüst (DP 100) beruhen. Da vor allem starke Interaktionen von Interesse sind, wurde aufgrund des Zeit- und Materialaufwands für ITC-Messungen lediglich Glycosylierungsgrade von 60 % und 80 % untersucht. Zusätzlich wurden drei Polypeptide mit aromatischem Spacer und endständiger Glucose vermessen (DS 49%, DS 86 %, DS 100 %). Für jedes Polypeptid wurden zwei unabhängige Messungen durchgeführt. Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse sind jeweils Mittelwerte aus beiden Messungen und in Tabelle 6-2 zusammen gefasst. Die Thermogramme der Einzelmessungen finden sich in Anhang 39 bis Anhang 46.



**Abb. 6-10 Abhängigkeit der mittels ITC bestimmten Dissoziationskonstante vom Glycosylierungsgrad verschiedener Glycopolypeptide**

Betrachtet man die Dissoziationskonstanten in Abhängigkeit vom Glycosylierungsgrad fällt für alle getesteten Glycopolypeptide eine Abnahme der Dissoziationskonstante mit steigendem Glycosylierungsgrad auf (Abb. 6-10). Dies stimmt mit den Ergebnissen der kurzkettigen PGA-Maltobiose aus Abb. 6-9 überein, wobei der Unterschied der Dissoziationskonstanten zwischen einem Glycosylierungsgrad von 80 % und 60 % nur noch ungefähr einer Verdoppelung entspricht (vgl. Tabelle 6-2). Darüber hinaus fällt auf, dass es zwischen PGA-Maltobiose und PGA-Maltotriose keine signifikanten Unterschiede in den Dissoziationskonstanten gibt. Eine Vergrößerung des Zuckerrestes vom Disaccharid zum Trisaccharid und damit auch eine Vergrößerung des Abstands der endständigen Zuckereinheit vom Polypeptidrückgrat scheint keine weitere Verbesserung der Interaktion mit Concanavalin A hervorzurufen. Auch für die

Glycopolypeptide mit Spacer findet man eine Abnahme der Dissoziationskonstante mit steigendem Substitutionsgrad. Ausnahmslos liegen diese Dissoziationskonstanten aber oberhalb derer von PGA-Maltobiose und PGA-Maltotriose. Die Interaktion von mit C<sub>ar</sub>-Glucose funktionalisierter PGA scheint daher etwas schwächer zu sein. Insgesamt sind aber alle Dissoziationskonstanten sehr niedrig verglichen mit den Dissoziationskonstanten der monovalenten Liganden<sup>10</sup>, was mit starken Affinitäten für alle getesteten Glycopolypeptiden gleichzusetzen ist.<sup>[142]</sup>



**Abb. 6-11** Enthalpien, Entropien und Gibbs-Energien der Glycopolypeptid-Concanavalin A Interaktionen mit Glycopolypeptiden (DP 100), die Maltobiose, Maltotriose und C<sub>ar</sub>-Glucose mit unterschiedlichem DS tragen

In Abb. 6-11 sind die Reaktionsenthalpien, Entropien und Gibbs-Energien der getesteten Glycopolypeptid-ConA-Interaktionen gezeigt. Es fällt auf, dass alle getesteten Interaktionen sehr ähnliche negative Gibbs-Energien haben. Bei den Interaktionen handelt es sich also um spontane, exotherme Prozesse. Betrachtet man jedoch die Enthalpien und Entropien, sind deutliche Unterschiede zwischen den Glycopolypeptiden mit Di- bzw. Trisacchariden und

<sup>10</sup> Assoziationskonstante Maltobiose<sup>[142]</sup>:  $K_a = 1.31 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \equiv K_d = 0.76 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Assoziationskonstante Maltotriose<sup>[142]</sup>:  $K_a = 1.34 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \equiv K_d = 0.75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Bestimmt über ITC-Messungen bei 25 °C in 0.1 M HBS Puffer (+ 0.9 M NaCl, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) pH 7.2

den Glycopolyeptiden mit aromatischen Spacern zu erkennen, was auf unterschiedliche Bindungsmechanismen hindeuten kann. Sowohl die Glycopolyeptide als auch das Lektin bilden in wässrigen Lösungen Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen des Lösungsmittels aus. Kommt es zu einer Bindung zwischen den Glycopolyeptiden und dem Lektin, werden die Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Bindungspartnern ersetzt (vgl. Kapitel 3). Das vorher vom Lektin gebundene Wasser wird dadurch wieder freigesetzt. So kommt es zwar zu einem Entropieverlust dadurch, dass die Bewegungsfreiheit der Zucker, und somit die der Glycopolyeptide, durch die Bindung ans Lektin reduziert wird. Dies kann jedoch durch vorteilhafte Entropieänderung durch das Freisetzen des gebundenen Wassers und vorteilhafte Enthalpieänderungen durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Bindungspartnern kompensiert werden.<sup>[96]</sup> Wie bereits erwähnt, tragen zur Enthalpieänderung vorwiegend polare Wechselwirkungen wie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bei. Es ist daher nicht weiter verwunderlich, dass sich für Glycopolyeptide mit Di- und Trisacchariden deutlich größere Enthalpieänderungen finden als für die PGA mit aromatischen Spacern. Der aromatische Spacer ist, bis auf die endständige Glucose-Einheit, hydrophob und bietet daher weniger Möglichkeiten Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Concanavalin A auszubilden, als Maltobiose und Maltotriose, die über eine Vielzahl von OH-Gruppen verfügen. Der Enthalpieterm ( $\Delta H$ ) ist für die PGA mit aromatischen Spacer zwar nicht so günstig, wie für PGA-Maltobiose oder PGA-Maltotriose, dafür ist aber auch der Entropieterm ( $T\Delta S$ ) weniger negativ. Sowohl der Enthalpie- als auch der Entropieterm sprechen daher für Unterschiede in der Bindung mit Concanavalin A.

Eine weiterer interessanter Punkt sind die funktionellen Valenzen ( $1/n$ ) bzw. die Zahl der zugänglichen Epitope auf dem Polypeptidrückgrat (Tabelle 6-2). Nur ein Bruchteil der angebundenen Zucker steht auch tatsächlich für Interaktionen zur Verfügung. Dies ist, wie bereits weiter oben erklärt, dem kurzen Abstand zwischen direkt benachbarten Zuckern geschuldet. Wird ein Zucker gebunden, ist es aus sterischen Gründen sehr unwahrscheinlich, dass Zucker in der unmittelbaren Nachbarschaft durch ein weiteres Concanavalin A Molekül gebunden werden können. Auffällig ist, dass bei einer Erhöhung des Glycosylierungsgrads von 60 % auf 80 % nur unwesentlich mehr Zucker für die Interaktion zugänglich werden. Für Polyglutaminsäure mit aromatischen Spacern ist sogar ein gegenläufiger Trend zu beobachten. Je höher der Substitutionsgrad, desto weniger Zucker sind auf dem Polypeptidrückgrat zugänglich. Bei

einer vollständigen Glycosylierung stehen grade einmal 17 % der angebundenen Zucker für die Interaktion zur Verfügung. Diese Beobachtung könnte ebenfalls sterische Gründe zur Ursache haben. Bei einer geringeren Zuckerdichte stehen die Zucker aus ihrer Umgebung hervor, sodass mehr Platz für das Concanavalin A vorhanden ist. Eine andere mögliche Ursache für die schlechtere Verfügbarkeit des Spacers, könnte am Auftreten helikaler Strukturen bei pH 7.4 liegen. Möglicherweise ist durch das  $\pi$ -Stacking der aromatischen Ringe auch die Beweglichkeit der Seitenketten zu sehr eingeschränkt für Interaktionen mit dem Concanavalin A. Um das zu klären, müsste die Interaktion mit racemischer PGA wiederholt werden. Racemische PGA ist nicht in der Lage helikale Strukturen auszubilden. Würde daher für racemische PGA mit dem aromatischen Spacer eine bessere Zugänglichkeit beobachtet werden, spräche einiges dafür, dass die helikalen Strukturen für die schlechtere Verfügbarkeit verantwortlich sind. Fazit ist, dass eine komplette Glycosylierung für eine gute Interaktion nicht notwendig ist bzw. sich sogar nachteilig auswirken kann.

**Tabelle 6-2 Übersicht über die aus ITC-Messungen erhaltenen thermodynamischen Parameter der Interaktionen von den hergestellten Glycopolypeptiden (DP 100) mit Concanavalin A**

	$K_d$ [nM]	$\Delta H$ [kcal/mol]	$\Delta G$ [kcal/mol]	$T\Delta S$ [kcal/mol]	n	1/n	zugängl. Epitope
<b>PGA-Maltobiose (DS 0.63)</b>	27 ± 5	-121 ± 1	-10.3 ± 0.1	-110 ± 1	0.038	26.3	41 %
<b>PGA-Maltobiose (DS 0.81)</b>	12 ± 4	-137 ± 2	-10.8 ± 0.2	-126 ± 2	0.0315	31.8	39 %
<b>PGA-Maltotriose (DS 0.60)</b>	31 ± 5	-114 ± 5	-10.2 ± 0.1	-104 ± 4	0.032	31.3	52 %
<b>PGA-Maltotriose (DS 0.83)</b>	15 ± 1	-130 ± 7	-10.7 ± 0.1	-120 ± 7	0.0275	36.4	44 %
<b>PGA-C<sub>ar</sub>-Glu (DS 0.49)</b>	83 ± 12	-71 ± 3	-9.7 ± 0.1	-61 ± 3	0.048	20.8	43 %
<b>PGA-C<sub>ar</sub>-Glu (DS 0.86)</b>	34.1 ± 0.3	-85 ± 2	-10.17 ± 0.01	-75 ± 2	0.055	18.2	22 %
<b>PGA-C<sub>ar</sub>-Glu (DS 1.00)</b>	24 ± 2	-71 ± 3	-10.4 ± 0.1	-60 ± 3	0.0605	16.7	17 %
<b>PGA-Glucose (DS 0.82)</b>	1140 ± 250	-49.0 ± 7	-8.1 ± 0.1	-40.9 ± 7.5	0.031	32.2	39 %

In den bisherigen Betrachtungen wurde PGA-Glucose nicht weiter berücksichtigt. Dies liegt daran, dass die Interaktion für PGA-Glucose deutlich schwächer ausfiel, als für die mit Di- und Trisacchariden bzw. Spacern ausgestatteten Polyglutaminsäuren. Es war schwierig Messbedingungen zu finden, bei denen eine Interaktion der PGA-Glucose mit dem Concanavalin A sichtbar war. Um überhaupt eine Interaktion zu sehen und genügend Reaktionswärme freizusetzen, mussten die Konzentrationen beider Bindungspartner deutlich erhöht werden. Bei Konzentrationen von 200 µM ConA in der Messzelle und 75 µM PGA-Glucose (DP 100, DS 0.82) in der Spritze konnten Wärmesignale detektiert werden. Allerdings sind auch diese Konzentrationen noch zu niedrig, was an dem sehr niedrigen C-Wert = 4 und der feh-

lenden sigmoidalen Kurvenform erkannt werden kann. Dies spricht für niedrige Affinitäten. Die erhaltene Dissoziationskonstante für die Interaktion lag bei 1.14  $\mu\text{M}$ , was um den Faktor 100 schwächer ist verglichen mit den anderen getesteten Glycopolypeptiden. Für PGA-Glucose mit einem Glycosylierungsgrad von 60 % konnten keine geeigneten Messbedingungen gefunden werden. Hierfür müsste, ähnlich wie für einen Glycosylierungsgrad von 80 %, mit deutlich höheren ConA Konzentrationen in der Messzelle gearbeitet werden, was aber auf Grund des hohen Preises des Proteins nicht sinnvoll erscheint. Es ist auch so deutlich zu erkennen, dass die Interaktion mit PGA-Glucose wesentlich schwächer ist, als die der anderen getesteten Glycopolypeptide.



## 7 Blockcopolymere

In den letzten Jahren wurden im Bereich der Wirkstofffreisetzung vor allem kolloidalen Arzneistoffträgern aufgrund ihrer hohen Beladungskapazität und ihrer Verteilung im menschlichen Körper Beachtung geschenkt.<sup>[28]</sup> Mit Blick auf eine spätere pharmazeutische Anwendung der Glycopolypeptide stellen daher Blockcopolymere einen interessanten Ansatz dar. Durch die Kombination des hydrophilen Glycopolypeptids mit einem zweiten Polymerblock mit anderen Eigenschaften (z.B. hydrophob, amphiphil, thermoresponsiv, etc.) können durch Selbstanordnung in Lösung mizellare Strukturen (Mizellen, Vesikel, Polymersome) geschaffen werden, die für die Einlagerung von Wirkstoffen genutzt werden können.<sup>[28, 30, 143]</sup> Befinden sich die Glycopolypeptide an der Oberfläche der Mizellen oder Vesikel, sollen die angeordneten Zucker über Lektin-Wechselwirkungen für ein zielgerichtetes Drug-Delivery genutzt werden. Die molekulare Erkennung von Zuckern ist in vielen biologischen Prozessen wie Infektionen, Entzündungen und Metastasenbildung beteiligt.<sup>[6, 96]</sup> Sind die medizinisch relevanten Zuckerstrukturen bekannt, könnten die Wirkstoffe gezielt an Entzündungsherde oder Krebsgewebe gebracht werden. Die Zucker würden somit eine Alternative zu anderen zielgerichteten Erkennungsstrukturen wie RGD-Sequenzen<sup>11</sup> oder Antikörpern darstellen.<sup>[30]</sup> Der Vorteil an der Verwendung von Polypeptiden gegenüber synthetischen Polymeren liegt zum einen daran, dass sie biodegradabel sind und zum anderen an ihrer Fähigkeit Sekundärstrukturen auszubilden. So konnte beispielsweise von J. RODRIGUEZ-HERNANDEZ und S. LECOMMANDOUX gezeigt werden, dass PGA durch seine helikale Struktur im sauren pH-Bereich die Ausbildung von Vesikeln begünstigen und diese stabilisieren kann.<sup>[144]</sup>

Die ersten Glycopolypeptid Polymersomen wurden 2012 von der Gruppe von A. HEISE hergestellt.<sup>[29]</sup> Durch sequenzielle ringöffnende Polymerisation von Benzyl-L-glutamat-NCA und Propargylglycin-NCA wurden Blockcopolypeptide hergestellt, die nachträglich durch HUISGEN Cycloaddition mit Galactose-Einheiten ausgestattet wurden. Je nach Blocklängenverhältnis bildeten die Blockcopolypeptide entweder wurmartige Mizellen oder Polymersome in Lösung. Trübungsmessungen mit dem Lektin RCA<sub>120</sub> zeigten, dass sich die Galactosereste außen an den Polymersomen befinden müssen und für biologische Interaktionen zur Verfügung stehen.<sup>[29]</sup>

---

<sup>11</sup> Die RGD-Sequenz ist eine Aminosäuresequenz aus L-Arginin, L-Glycin und L-Asparaginsäure, die in Proteinen vorkommt und bspw. der Zelladhäsion dient. Sie kann von Membranproteinen (Integrine) gebunden werden.

Um zu überprüfen, ob eine Wirkstoffeinlagerung in mizellare Strukturen möglich ist, werden häufig Farbstoffe als Modellsubstanzen verwendet. So konnten DAS et. al. über FRET-Messungen<sup>12</sup> zeigen, dass mit Glycopolypeptid-*block*-Polypropylenoxid Polymersome gebildet werden können, in die zeitgleich sowohl hydrophobes Rhodamin B Octadecylesterperchlorat (RBOE) als auch hydrophiles Calcin eingelagert werden können.<sup>[30]</sup> Je nach Wahl des zweiten Blocks sind Glycopolypeptide daher nicht auf hydrophile Wirkstoffe beschränkt.

Besonders reizvoll für medizinische Anwendungen sind stimuli-responsive Materialien. Wie bereits beschrieben, zeigen Polypeptide wie Poly-L-glutaminsäure und Poly-L-lysin pH-responsives Verhalten.<sup>[145]</sup> Eine Kombination von pH-responsiven Polypeptiden mit einem thermoresponsiven zweiten Block ist für medizinische Zwecke besonders interessant, da beispielsweise Entzündungen im Körper mit einer erhöhten Gewebetemperatur und einem reduziertem pH-Wert<sup>13</sup> einhergehen.<sup>[146, 147]</sup> ZHAO et al. konnten Blockcopolymere aus Poly-L-lysin (PLL) und thermoresponsivem Poly-*N*-Isopropylacrylamid (pNIPAM) herstellen, die auf beide Stimuli reagieren.<sup>[148]</sup> Die pNIPAM-*b*-PLL Blockcopolymere bilden mizellenartige Aggregate mit pNIPAM als hydrophoben Block bei niedrigen pH-Werten und hohen Temperaturen. Bei hohen pH-Werten und niedrigen Temperaturen hingegen, stellt das pNIPAM den hydrophilen Block und das PLL den hydrophoben Block dar. Interessant wäre, ob dies analog auch mit Poly-L-glutaminsäure und pNIPAM funktioniert und eine Glycosylierung der PGA-pNIPAM Blockcopolymere Interaktionen mit Lektinen ermöglicht. Es wurden daher Blockcopolymere ausgehend von amin-endfunktionalisiertem pNIPAM über ringöffnende Polymerisation mit BLG-NCA hergestellt.<sup>14</sup> Das PBLG-*b*-pNIPAM wurde anschließend zu PGA-Na-*b*-pNIPAM Blockcopolymeren entschützt, an die in einer polymeranalogen Reaktion Zucker angebunden wurden. Als Referenzsystem wurden Poly-L-lysin-*b*-pNIPAM Blockcopolymere hergestellt. Eine Übersicht über die durchgeführten Reaktionen findet sich in Abb. 7-1. Eine genaue Beschreibung der durchgeführten Synthesen und Charakterisierung der hergestellten Blockcopolymere, sowie Untersuchungen zur Ausbildung mizellarer Strukturen finden sich in den folgenden Unterkapiteln.

---

<sup>12</sup> FRET: Förster-Resonanzenergietransfer

<sup>13</sup> Entzündetes Gewebe pH 4-5, gesundes Gewebe pH 7.4

<sup>14</sup> Die Durchführung wurde im Rahmen eines Forschungspraktikums unterstützt von L. THOMAS

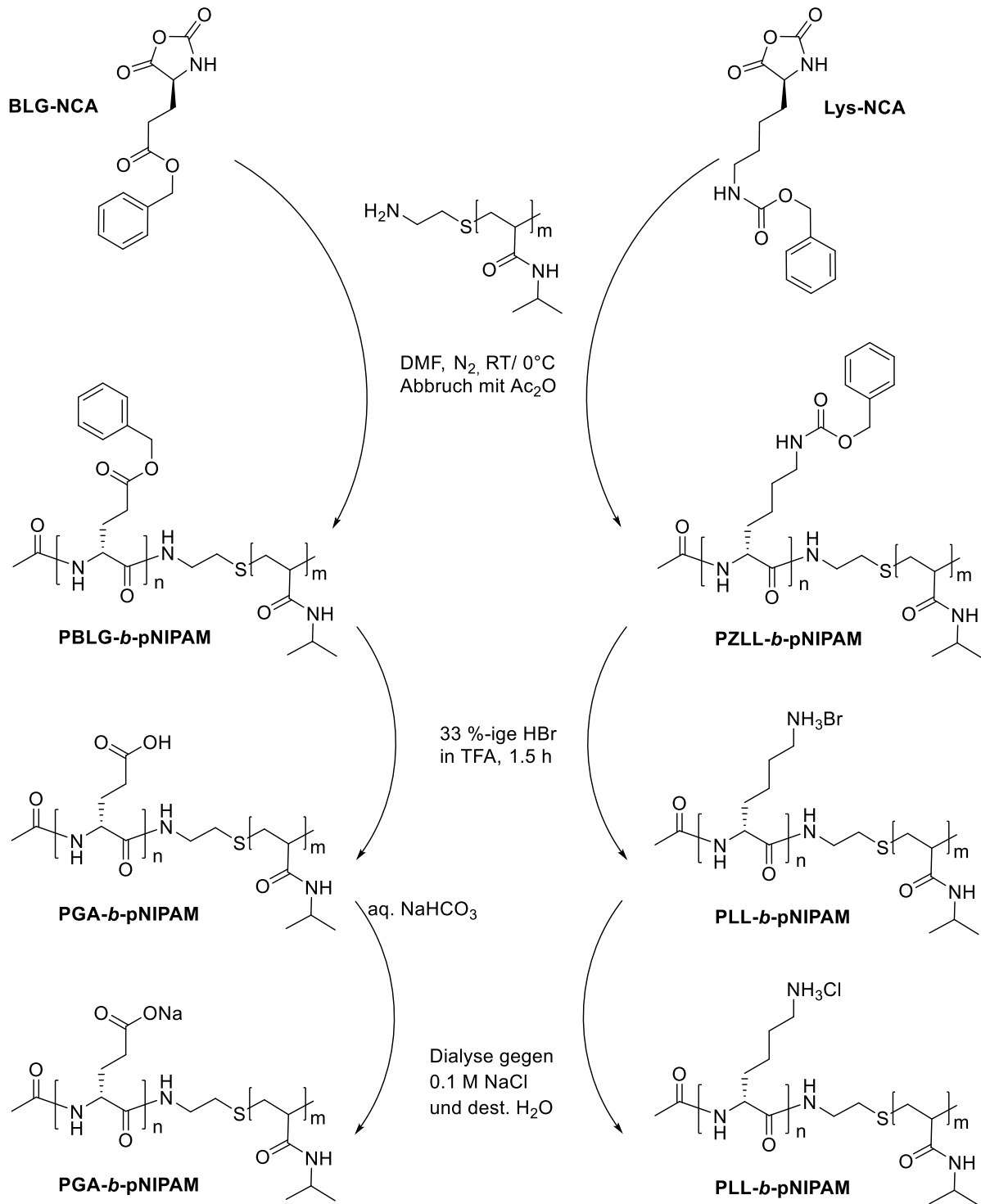


Abb. 7-1 Syntheschema für die Herstellung der Diblockcopolymere PGA-*b*-pNIPAM (links) und PLL-*b*-pNIPAM (rechts)

## 7.1 Synthese von PGA-*b*-pNIPAM

Die Synthese des PGA-*b*-pNIPAM's erfolgt in zwei Stufen über PBLG-*b*-pNIPAM. Für die Synthese von PBLG-*b*-pNIPAM wurde amin-endfunktionalisiertes pNIPAM als Makroinitiator für die ringöffnende Polymerisation von BLG-NCA eingesetzt. Die Polymerisation wurde analog zu den Homopolypeptiden für 7 Tage bei 0 °C unter N<sub>2</sub> durchgeführt. Das verwendete pNIPAM besitzt ein durchschnittliches Molekulargewicht von  $M_n = 2,500 \text{ g/mol}^{15}$ . Dies entspricht einem Polymerisationsgrad von 22 Wiederholungseinheiten. Es wurden verschiedene pNIPAM/PBLG-Blocklängenverhältnisse eingestellt und die erhaltenen Blockcopolymere mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie, GPC und FTIR-Spektroskopie charakterisiert. Die Blocklängenverhältnisse wurden über GPC Messungen in DMF (+LiBr) aus dem Zahlenmittel des Molekulargewichts  $M_n$  berechnet, indem von dem ermittelten Molekulargewicht die 2,500 g/mol des eingesetzten pNIPAM's abgezogen wurden und durch die Wiederholungseinheit des PBLGs geteilt wurde. Zusätzlich wurde versucht, das Blocklängenverhältnis über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie aus den Signalen der sechs Protonen der Isopropylgruppe des pNIPAM's (a) im Verhältnis zur Methylengruppe der Benzylschutzgruppe des PBLGs (h) zu erhalten (vgl. Anhang 13). Eine Übersicht der Ergebnisse findet sich in Tabelle 7-1.

**Tabelle 7-1 Ergebnisse der PBLG-*b*-pNIPAM Synthese**  
<sup>a</sup> über GPC (DMF + LiBr) bestimmt, <sup>b</sup> über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestimmt, \* pNIPAM : PBLG

theor. Verhältnis*	$M_n$ (GPC) [g/mol]	$\bar{D}$	$M_n$ (PBLG) [g/mol]	$P_n^a$	Blocklängen- verhältnis <sup>a,*</sup>	Blocklängen- verhältnis <sup>b,*</sup>
1 : 1	7,400 ± 300	1.11	4,900	22	1 : 1	1 : 1.7
1 : 2	10,900 ± 200	1.05	8,400	38	1 : 1.7	1 : 3.3
1 : 3	14,900 ± 100	1.04	12,400	57	1 : 2.6	1 : 4.8

Die Bestimmung der Blocklängenverhältnisse über GPC-Messungen liefert relativ gute Übereinstimmungen mit dem eingestellten Blocklängenverhältnissen für alle drei hergestellten Blockcopolymere. Betrachtet man jedoch die Blocklängenverhältnisse, die aus den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren erhalten wurden, fällt eine deutliche Abweichung zu den theoretischen Verhältnissen auf. Der PBLG-Block ist in allen Fällen deutlich größer als eingestellt. Dies liegt sehr wahrscheinlich daran, dass pNIPAM eine schlechte Löslichkeit in Chloroform hat, indem die

<sup>15</sup> Herstellerangabe:  $M_n = 2000\text{-}3000 \text{ g/mol}$ , für die Berechnungen wird sich auf den Mittelwert bezogen

Spektren mit Zusatz von Trifluoressigsäure aufgenommen wurden. So finden sich zwar Signale von beiden Blöcken in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren, allerdings sollte eine Quantifizierung mit Vorsicht bedacht sein, da der pNIPAM Block nicht gut gelöst ist und es dadurch zu einer Überbestimmung des PBLG-Blocks kommt. Für eine Bestimmung der Blocklängen über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie müssten daher andere Lösungsmittel verwendet werden, in denen beide Blöcke eine gute Löslichkeit zeigen (z.B. DMF). Die Schwierigkeit hierbei ist jedoch, dass das PBLG Helix-brechende Zusätze benötigt. Ausgehend von den GPC Ergebnissen, scheint jedoch die Einstellung des Polymerisationsgrades auch bei der Verwendung von Makroinitiatoren relativ gut zu funktionieren.

Die Benzylgruppe des PBLG-Blocks wurde im Anschluss an die Polymerisation analog zu den Homopolypeptiden mit Bromwasserstoff-Lösung sauer abgespalten, um eine Racemisierung des Rückgrats zu unterdrücken. Hierbei wird wiederum die wasserunlösliche, protonierte Form der PGA erhalten. Daher wurden auch die Blockcopolymere anschließend mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung deprotoniert. Nach Dialyse und Lyophilisation wurde dann das wasserlösliche PGA-Na-*b*-pNIPAM erhalten.

Aus den NMR-Daten des PGA-Na-*b*-pNIPAM ist zu erkennen, dass die Debenzylierung vollständig abgelaufen ist. Sowohl die Signale des Benzylrings (ca. 7.2 ppm) als auch die Signale der Methylengruppe des Benzylesters (ca. 5.1 ppm) fehlen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des entschützten Blockcopolymers (vgl. Anhang 14). Die übrigen Signale von pNIPAM und PGA-Na sind aber alle vorhanden. Betrachtet man wiederum die Molekulargewichtsverteilungen und die Blocklängenverhältnisse (vgl. Tabelle 7-2), fallen deutliche Unterschiede zum Ausgangspolymer PBLG-*b*-pNIPAM auf. Ein Vergleich der Dispersitäten vor und nach der Debenzylierung zeigt eine deutliche Zunahme der Dispersität nach der Entschützung. Vor der sauren Hydrolyse lag die Dispersität ungefähr bei 1.05, was für eine enge Molekulargewichtsverteilung spricht, wie es für eine kontrollierte Polymerisation üblich ist. Nach der Hydrolyse liegt die Dispersität bei ca. 2, was einer sehr breiten Molekulargewichtsverteilung entspricht, ähnlich den Ergebnissen, die man bei einer Polykondensation erwarten würde. Die Zunahme der Dispersität spricht für einen Abbau des Blockcopolymers entweder durch die saure Hydrolyse oder die basische Deprotonierung mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Da die Homopolypeptide dieses Verhalten nicht zeigen, kommt es vermutlich entweder zu einer Ketten-

Spaltung im pNIPAM-Block oder wahrscheinlicher zu einer Spaltung des Thioethers in der Verbindung beider Blöcke.

**Tabelle 7-2 Ergebnisse der PGA-Na-*b*-pNIPAM Synthese**

<sup>a</sup> über GPC (Phosphatpuffer pH 7.4) bestimmt, <sup>b</sup> über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestimmt, \* pNIPAM : PGA-Na

theor. Verhältnis*	M <sub>n</sub> (GPC) [g/mol]	Đ	M <sub>n</sub> (PGA) [g/mol]	P <sub>n</sub> <sup>a</sup>	Blocklängen- verhältnis <sup>a,*</sup>	Blocklängen- verhältnis <sup>b,*</sup>
1 : 1	4,500	2.07	2,000	16	1 : 0.7	1 : 1.7
1 : 2	6,200	2.21	3,700	29	1 : 1.3	1 : 2.5
1 : 3	7,200	2.25	4,700	38	1 : 1.7	1 : 3.2

Um später den Einfluss der Zucker und des Glycosylierungsgrades auf die Fähigkeit Mizellare Strukturen in Lösung auszubilden zu untersuchen, wurden die Blockcopolymere glycosyliert. Hierfür wurde analog wie bei den Homopolypeptiden DMT-MM als Kupplungsreagenz gewählt. Die entsprechende Vorgehensweise und die eingesetzten Verhältnisse von DMT-MM zu PGA-Na-Wiederholungseinheiten finden sich im Experimentellen Teil dieser Arbeit (vgl. 9.7.6). Als Aminozucker wurde Glucosylamin gewählt. Nach erfolgreicher Kupplungsreaktion finden sich im <sup>1</sup>H-NMR der glycosylierten PGA-Na-*b*-pNIPAM Copolymere (s. Anhang 15) nicht nur die Signale des PGA-Blocks (c,d,f) und des pNIPAM-Blocks (f,g,h,i), sondern wie erwartet auch die Signale des Zuckergerüsts (n-r), sowie das Signal des Protons am anomeren C-Atom des Zuckers (z). Vergleicht man die erhaltenen Glycosylierungsgrade an den Blockcopolymeren (s. Tabelle 9-19) mit denen der entsprechenden Homopolypeptide (s. Tabelle 9-12) treten keine signifikanten Unterschiede auf. Für gleiche DMT-MM zu PGA-Na-Verhältnisse werden ähnliche Glycosylierungsgrade erhalten unabhängig davon, ob die PGA-Na als Homopolypeptid oder als Bestandteil eines Blockcopolymers vorliegt.

## 7.2 Synthese von PLL-*b*-pNIPAM

Als Referenzsubstanz für spätere Untersuchungen der Mizellenbildung mittels dynamischer Lichtstreuung wurde zusätzlich noch das bereits in der Literatur beschriebene Poly-L-lysin-*b*-pNIPAM hergestellt.<sup>[148]</sup> Das Lysin-NCA-Monomer wurde aus der Z-geschützten Aminosäure und Triphosgen hergestellt.

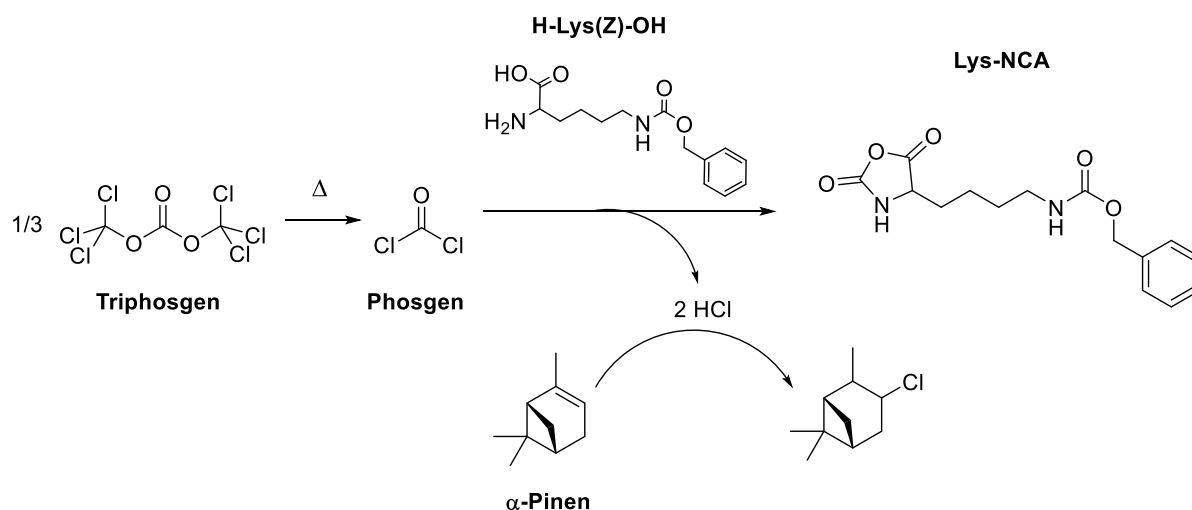


Abb. 7-2 Synthese des Lysin-NCA Monomers

Für die Synthese des NCA-Monomers wurde eine Literaturvorschrift von HABRAKEN et. al. verwendet.<sup>[149]</sup> N<sub>ε</sub>-Carbobenzyloxy-L-lysin reagiert bei 77 °C mit *in situ* entstehendem Phosgen unter HCl-Abspaltung zum ε-Z-Lysin-NCA (s. Abb. 7-2). Das frei werdende HCl wird mit zugesetztem α-Pinen der Reaktion entzogen. Zur Entfernung möglicher Nebenprodukte und zur weiteren Aufreinigung wurde das NCA-Monomer nach der Reaktion aus einem Gemisch von Ethylacetat und *n*-Heptan umkristallisiert, damit es bei der späteren Polymerisation nicht zu ungewollten Kettenabbrüchen durch Verunreinigungen kommt. Das hergestellte NCA-Monomer wurde schließlich mit einer Ausbeute von 82 % erhalten und über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie (vgl. Anhang 16) sowie Elementaranalyse charakterisiert (s. Tabelle 7-3). Beide Methoden zeigten eine gute Übereinstimmung mit den Erwartungen, sodass eine weitere Aufreinigung durch zusätzliche Umkristallisationsschritte nicht nötig war.

Tabelle 7-3 Ergebnisse der Elementaranalyse vom Lysin-NCA Monomer, \*Mittelwert aus 2 Messungen

$C_{15}H_{18}N_2O_5$	theoretisch	gemessen*	Abweichung
<b>C</b>	58.82 %	58.97 %	+ 0.3 %
<b>N</b>	9.15 %	9.09 %	- 0.7 %
<b>H</b>	5.92 %	5.92 %	± 0.0 %

Die Synthese des PZLL-*b*-pNIPAM's wurde analog zur vorher beschriebenen Synthese des PBLG-*b*-pNIPAM's bei 0 °C in DMF mit amin-endfunktionalisiertem pNIPAM als Makroinitiator durchgeführt. Auch hier wurden drei verschiedene Blocklängenverhältnisse getestet. Durch GPC-Messungen in DMF (+LiBr), sowie  $^1H$ -NMR-Spektroskopie in  $CDCl_3$ +TFA (3:1) wurden die resultierenden Blocklängenverhältnisse untersucht (s. Tabelle 7-4).

Tabelle 7-4 Ergebnisse der PZLL-*b*-pNIPAM Synthese  
<sup>a</sup> über GPC (DMF + LiBr) bestimmt, <sup>b</sup> über  $^1H$ -NMR-Spektroskopie bestimmt, \* pNIPAM : PZLL

theor. Verhältnis*	$M_n$ (GPC) [g/mol]	$\bar{D}$	$M_n$ (PZLL) [g/mol]	$P_n^a$	Blocklängen- verhältnis <sup>a,*</sup>	Blocklängen- verhältnis <sup>b,*</sup>
1 : 1	8,800 ± 300	1.19	6,300	24	1 : 1.1	1 : 1.4
1 : 2	12,100 ± 200	1.06	9,600	37	1 : 1.7	1 : 3.3
1 : 3	16,100 ± 100	1.05	13,600	52	1 : 2.4	1 : 4.0

Wie auch fürs PBLG-*b*-pNIPAM, zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den über GPC und  $^1H$ -NMR-Spektroskopie bestimmten Blocklängenverhältnissen. Die über GPC-Messungen erhaltenen Blocklängen stimmen wie beim PBLG-*b*-pNIPAM in guter Näherung mit den eingestellten Verhältnissen überein, wenn man berücksichtigt, dass für den pNIPAM-Block ein Molekulargewicht von 2,500 g/mol angenommen wird. Da für die  $^1H$ -NMR-Messungen des PZLL-Blocks gleichermaßen Helix-brechende Lösungsmittel benötigt werden, wurde das  $^1H$ -NMR-Spektrum wiederum in  $CDCl_3$ :TFA (3:1) aufgenommen, was eine korrekte Quantifizierung des pNIPAM-Blocks verhindert.

Die Abspaltung der Z-Schutzgruppe erfolgt ebenfalls in TFA mit Bromwasserstoff-Lösung (33 %-ig in Essigsäure). Während der Reaktion beginnt das Poly-L-lysin Hydrobromid bereits aus der TFA-Lösung auszufallen. Das Produkt wurde im Anschluss an die Reaktion mit Diethylether gewaschen, getrocknet und gegen NaCl-Lösung dialysiert, um es in das Poly-L-lysin



Hydrochlorid zu überführen. Da es sich beim Poly-L-lysin Hydrochlorid, um ein Polykation handelt, konnte für die GPC-Messungen nicht derselbe Säulensatz, wie für die PGA-Na-*b*-pNIPAM Polymere, verwendet werden. Vom PLL-*b*-pNIPAM wurden daher GPC-Messungen auf Novema-Säulen von PSS in 0.1 M NaCl-Lösung mit Zusatz von 0.1 % TFA durchgeführt.

**Tabelle 7-5 Ergebnisse der PLL-*b*-pNIPAM Synthese**  
<sup>a</sup> über GPC (0.1 M NaCl + 0.1 % TFA) bestimmt, <sup>b</sup> über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestimmt, \* pNIPAM : PLL

theor. Verhältnis*	M <sub>n</sub> (GPC) [g/mol]	Đ	M <sub>n</sub> (PLL) [g/mol]	P <sub>n</sub> <sup>a</sup>	Blocklängen- verhältnis <sup>a,*</sup>	Blocklängen- verhältnis <sup>b,*</sup>
1 : 1	8,900 ± 100	1.01	6,400	39	1 : 1.8	1 : 1.3
1 : 2	10,500 ± 300	1.01	8,000	48	1 : 2.2	1 : 2.9
1 : 3	12,000 ± 700	1.01	9,500	73	1 : 3.3	1 : 3.1

Interessanterweise zeigen die pNIPAM-*b*-PLL Blockcopolymere nach der Entschützungsreaktion weiterhin eine enge Molekulargewichtsverteilung (s. Tabelle 7-5). Dies widerspricht der Vermutung für die PGA-Na-*b*-pNIPAM Copolymere, dass es durch die saure Hydrolyse zu einer Kettenspaltung des Thioethers in der Verknüpfung beider Blöcke kommt. Wäre dies der Fall, müssten auch für das PLL-*b*-pNIPAM hohe Dispersitäten beobachtet werden. Daher wurde die Synthese des im Rahmen eines Forschungspraktikums hergestellten PGA-*b*-pNIPAM's für die Zusammensetzung von 1 : 3 wiederholt und überprüft. Wie anhand von Tabelle 7-6 zu sehen ist, zeigt die Wiederholung der Synthese des PGA-Na-*b*-pNIPAM's, dass vergleichbar niedrige Dispersitäten wie für das PLL-*b*-pNIPAM erhalten werden. Ein Abbau der Blockcopolymere durch saure Hydrolyse wird daher ausgeschlossen. Wie es zu den Abweichungen in den Dispersitäten zwischen den von L. THOMAS hergestellten Blockcopolymeren und dem nachträglich synthetisierten Blockcopolymer gekommen ist, lässt sich im Nachhinein nicht mehr herausfinden.

**Tabelle 7-6 Wiederholung der PGA-Na-*b*-pNIPAM Synthese**  
<sup>a</sup> über GPC (Phosphatpuffer pH 7.4) bestimmt, <sup>b</sup> über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestimmt, \* pNIPAM : PGA-Na

theor. Verhältnis*	M <sub>n</sub> (GPC) [g/mol]	Đ	M <sub>n</sub> (PGA) [g/mol]	P <sub>n</sub> <sup>a</sup>	Blocklängen- verhältnis <sup>a,*</sup>	Blocklängen- verhältnis <sup>b,*</sup>
1 : 3	10,300 ± 400	1.01	7,800	61	1 : 2.8	1 : 3.5

### 7.3 Untersuchungen zur Partikelbildung mittels dynamischer Lichtstreuung

Die hergestellten Blockcopolymere wurden, auf ihre Fähigkeit temperaturabhängig, mizellare Strukturen in Lösung auszubilden, untersucht. Hierfür wurde als Methode dynamische Lichtstreuung (DLS) gewählt, auf deren Messprinzip im folgenden Abschnitt kurz eingegangen wird, bevor die Ergebnisse der Partikelbildung betrachtet werden.

#### 7.3.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Trifft Licht einer bestimmten Frequenz auf Moleküle, wird durch das elektrische Feld der Lichtwelle die Elektronenhülle des Moleküls zum Schwingen angeregt. Hierdurch kommt es zur Ausbildung eines oszillierenden Dipolmoments im Molekül und zur Emission von Streulicht, das dieselbe Frequenz wie das eingestrahlte Licht besitzt. Bei der dynamischen Lichtstreuung wird die zeitliche Änderung der Streulichtintensität beobachtet. Hierfür wird die Streulichtintensität in einem sehr kleinen Messvolumen in kurzen Zeitintervallen gemessen ( $\mu\text{s}$ ) und die Intensitätsfluktuationen verfolgt, die durch Interferenzen des Partikelstreulichts entstehen. Kleine Partikel in Lösung bewegen sich durch Zusammenstöße mit Lösemittelmolekülen schneller, als große Partikel (Brown'sche Bewegung), wodurch sich auch schnellere Änderungen der Streulichtintensität zeigen, als für große Partikel. Die Geschwindigkeit der Intensitätsfluktuation liefert durch eine Autokorrelation Rückschlüsse auf die Brown'sche Bewegungsgeschwindigkeit der Partikel und somit auf den Diffusionskoeffizienten. Aus dem Diffusionskoeffizienten lässt sich dann über die Stokes-Einstein-Beziehung (7-1) der hydrodynamische Radius  $r_h$  der Partikel bestimmen.<sup>[150, 151]</sup>

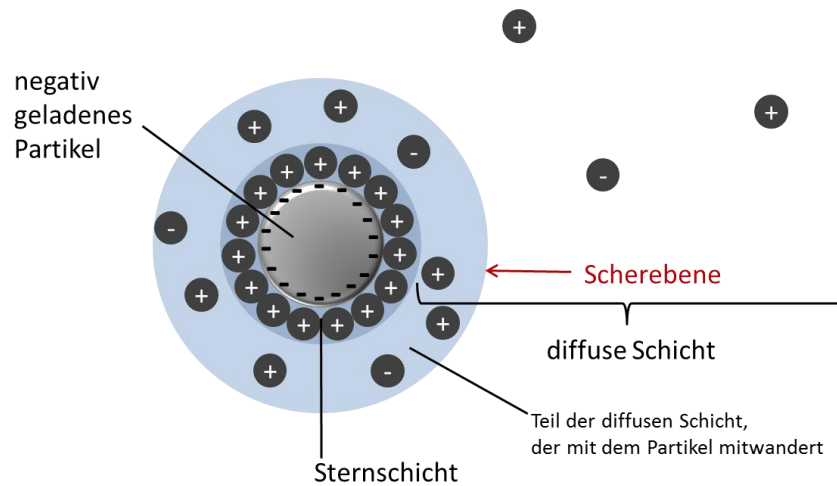
$$r_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (7-1)$$

Hierbei muss man jedoch beachten, dass bei den Betrachtungen von sphärischen Partikeln ausgegangen wird. Außerdem ist die Diffusionsgeschwindigkeit auch von der Ionenstärke des Mediums abhängig. Eine große elektrochemische Doppelschicht aus Ionen, um die Partikel herum, reduziert die Diffusionsgeschwindigkeit, wodurch der hydrodynamische Radius des Partikels größer erscheinen kann, als er tatsächlich ist. Die International Organization for Standardization empfiehlt daher DLS-Messungen in 10 mM NaCl-Lösung durchzuführen (ISO 22412:2008).<sup>[150]</sup>

Darüber hinaus ergibt sich aus der Rayleigh-Gleichung, dass die Intensität des Streulichts sowohl abhängig von Wellenlänge  $\lambda$  des eingestrahnten Lichts ( $I \sim 1/\lambda^4$ ) als auch vom Parti-

keldurchmesser  $d$  ( $I \sim d^6$ ) ist. Das heißt, je höher die Energie des eingestrahlt Lichts und je größer das Partikel, desto stärker ist die Intensität des Streulichts. Ein 100 nm großes Partikel streut in etwa 1,000,000-mal so stark, wie ein 10 nm großes Partikel. Aus diesem Grund ist es schwierig, kleine Partikel neben großen Partikeln zu detektieren. Obwohl sie in einer deutlich größeren Anzahl vorliegen können, zeigen sie eine kleinere Signalintensität, als wenige große Partikel. Die Proben sollten daher nach Möglichkeit monodispers sein, wenn nicht gerade das Aggregationsverhalten untersucht werden soll.<sup>[150, 151]</sup>

Neben der Messung der Partikelgröße kann über dynamische Lichtstreuung auch das Zetapotential bestimmt werden, das Hinweise auf die Oberflächenladung der Partikel und die Stabilität der Partikel in Lösung gibt. Um ein geladenes Partikel in Lösung bildet sich eine elektrochemische Doppelschicht aus Lösungsmittelmolekülen aus (s. Abb. 7-3). Die elektrochemische Doppelschicht besteht aus einer inneren Schicht fest assoziierter Lösungsmittelmoleküle, der sogenannten Sternschicht. Die Sternschicht besteht für ein negativ geladenes Partikel aus fest gebundenen dehydratisierten und hydratisierten Kationen. Um diese innere Schicht bildet sich eine weitere, diffusere Schicht aus locker gebundenen Ionen aus. Dadurch erscheint das Partikel nach außen neutral. Bewegt sich das Partikel in Lösung, wird sich ein Teil der diffusen Schicht auf Grund von Scherung nicht mit dem Partikel mitbewegen. Nach außen erscheint das Partikel dann nicht mehr elektrisch neutral. Es bildet sich ein Potential an der Scherebene des Partikels aus. Dieses Potential wird als Zetapotential bezeichnet. Die Größe des Zetapotentials gibt Hinweise auf die Stabilität der Partikel in Lösung. Wenn die Partikel ein hohes negatives oder positives Zetapotential aufweisen, stoßen sich die Partikel in Lösung ab. Ist das Zetapotential jedoch nur schwach negativ oder positiv, neigen die Partikel dazu zu aggregieren. Als Grenzwerte für stabile Partikel gelten Zetapotentiale von  $\pm 30$  mV. Nichts destotrotz ist es möglich, dass auch dispergierte Partikel mit einem Zetapotential größer als  $\pm 30$  mV in Lösung nicht stabil sind und beispielsweise sedimentieren, wenn sie eine hohe Dichte aufweisen.<sup>[151]</sup>



**Abb. 7-3 Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht eines negativ geladenen Partikels in Lösung und Lage der Scherebene, an der sich das Zetapotential ausbildet**

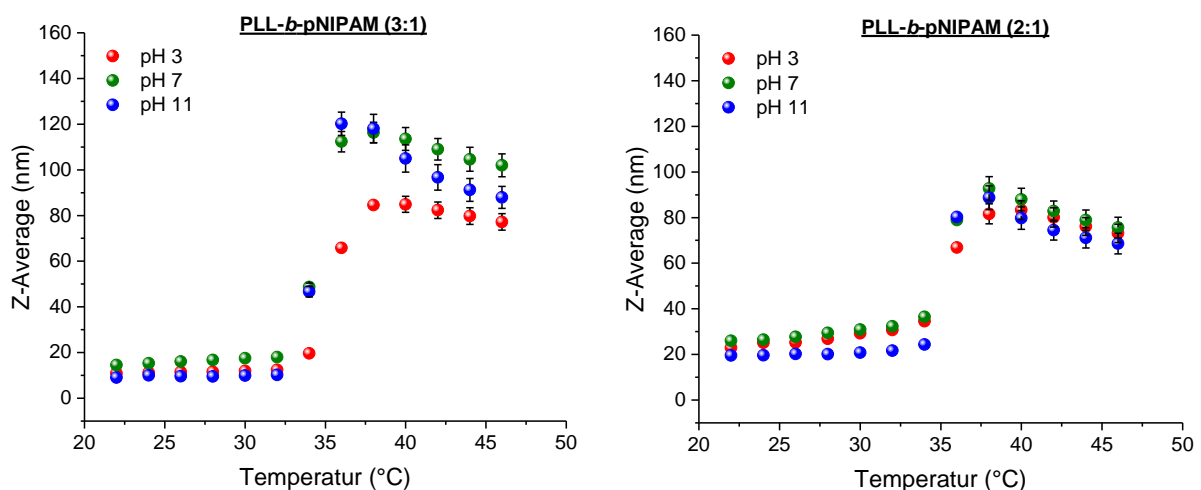
Messtechnisch lässt sich das Zetapotential  $\zeta$  über Laser-Doppler-Elektrophorese bestimmen. Hierbei wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel in einem elektrischen Feld mit Hilfe des Doppler-Effekts bestimmt. Bewegen sich die Partikel, wird eine Frequenzverschiebung des Streulichts hervorgerufen. Diese Frequenzverschiebung lässt sich, obwohl sie sehr klein ist, durch einen geschickten Messaufbau („optical mixing“) von der Frequenz des Primärstrahls trennen. Aus der Frequenzverschiebung lässt sich dann die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel berechnen. Dividiert man die Wanderungsgeschwindigkeit durch die elektrische Feldstärke, wird die elektrophoretische Mobilität  $\mu_e$  erhalten, aus der letztendlich das Zetapotential  $\zeta$  für sphärische Partikel vereinfacht nach (7-2) berechnet werden kann.

$$\zeta = \frac{3\eta\mu_e}{2\varepsilon_0\varepsilon_r} \quad (7-2)$$

mit  $\eta$ : Viskosität,  $\varepsilon_0$  – absolute und  $\varepsilon_r$  relative Dielektrizitätskonstante des Mediums

### 7.3.2 Temperaturabhängige Partikelgrößenmessungen

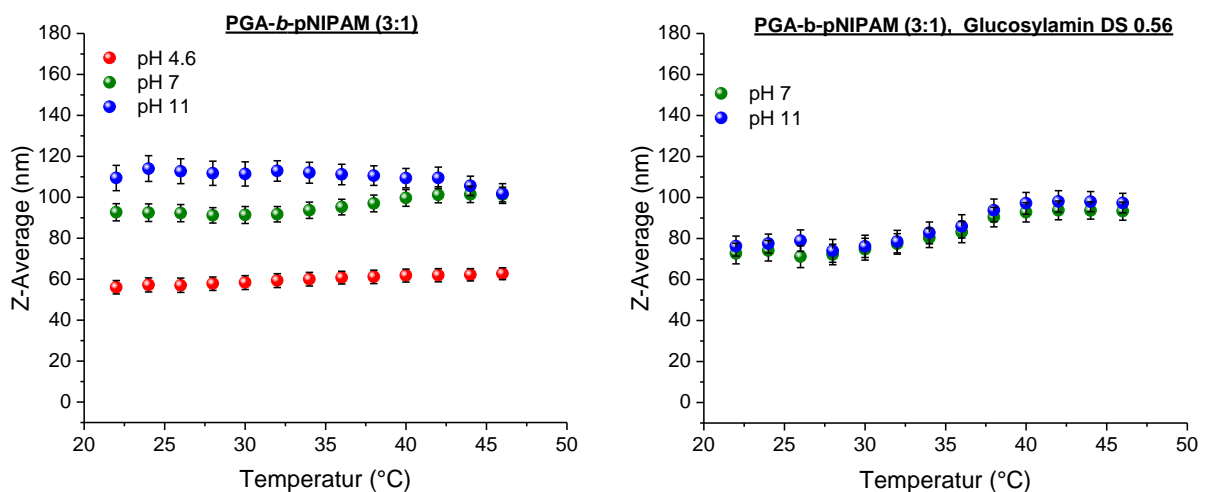
Von den hergestellten Blockcopolymeren wurden temperaturabhängige Partikelgrößenmessungen bei verschiedenen pH-Werten mit dem Zetasizer Nano ZS der Firma MALVERN INSTRUMENTS aufgenommen. Die Wahl des Temperaturbereichs erfolgte aufgrund der LCST (lower critical solution temperature) von pNIPAM (32 °C).<sup>[148]</sup> Unterhalb von 32 °C ist pNIPAM gut wasserlöslich, oberhalb von 32 °C tritt jedoch eine Mischungslücke auf, die zu einer Phase separation und damit zu einem Ausfällen des pNIPAM's aus der wässrigen Lösung führt. Als Temperaturbereich wurde daher 22-46 °C mit Intervallen von 2 °C gewählt, sodass die LCST vom pNIPAM mittig im ausgewählten Messbereich liegt. Für die Blockcopolymere wurden jeweils Partikelgrößenmessungen im sauren, neutralen und basischen pH-Bereich aufgenommen. Es wird erwartet, dass die Blockcopolymere unterhalb der LCST vollständig gelöst vorliegen, da sowohl der Peptid- als auch der pNIPAM-Block in diesem Temperaturbereich wasserlöslich sind. Wird die Temperatur über die LCST vom pNIPAM angehoben, wird die Löslichkeit des pNIPAM-Blocks drastisch reduziert, während der Peptidblock weiterhin gut löslich sein sollte. Dies sollte zur Ausbildung von nanopartikulären Strukturen führen, bei denen sich der pNIPAM-Block im Inneren des Partikels befindet und die Peptidblöcke nach außen zeigen.<sup>[148]</sup> Für jede Temperatur wurden 3 Messungen á 30 Scans durchgeführt. Die gezeigten Messpunkte entsprechen dem Mittelwert. Alle Partikelgrößenmessungen wurden in 10 mM NaCl-Lösung ( $c = 4 \text{ mg/mL}$ ) durchgeführt, um die Ionenstärke des Mediums und damit die Größe der Hydrathülle für alle Blockcopolymere vergleichbar zu halten.



**Abb. 7-4** temperaturabhängige Partikelgrößenmessungen von PLL-*b*-pNIPAM (3:1 –  $\bar{M}_n$  1.01, links) und PLL-*b*-pNIPAM (2:1 –  $\bar{M}_n$  1.01, rechts) bei verschiedenen pH-Werten<sup>16</sup>

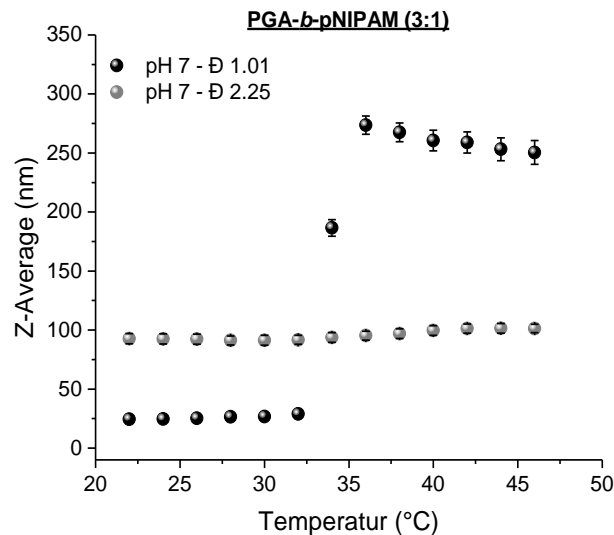
<sup>16</sup> Fehlerberechnung erfolgte nur für die monomodalen Proben über die Standardabweichung. Bevor sich die Partikel bilden ist die Probe multimodal.

Betrachtet man zunächst die PLL-*b*-pNIPAM Copolymere mit einem Blocklängenverhältnis von 3:1 fällt auf, dass sich pH-unabhängig ab einer Temperatur von ca. 34 °C Partikel in Lösung bilden (vgl. Abb. 7-4). Die höchste Partikelgröße (Z-Average) wird für alle pH-Werte bei 38 °C beobachtet. Bei einer weiteren Steigerung der Temperatur nimmt die Partikelgröße leicht ab. Dies liegt sehr wahrscheinlich aber nicht an der Temperaturerhöhung, sondern daran, dass die Partikel mit der Zeit zu sedimentieren beginnen und das Messfenster verlassen. Im sauren pH-Bereich werden etwas kleinere Partikelgrößen ( $\approx 80$  nm) beobachtet als für neutrale und basische pH-Werte ( $\approx 110$ -120 nm). Da es sich bei Poly-L-lysin um ein Polykation handelt, liegt dieses bei pH 3 in seiner protonierten Form und somit geladen vor ( $\text{R-NH}_3^+$ ). Hierdurch kommt es zu elektrostatischen Abstoßungen innerhalb und zwischen den PLL-Ketten. Bei neutralem und basischen pH-Werten liegen die Amingruppen nicht protoniert vor ( $\text{R-NH}_2$ ), wodurch eventuell eine dichtere Packung der Polymerketten möglich wird und größere Mizellen gebildet werden könnten. Allerdings lassen sich keine eindeutigen Trends erkennen. PLL-*b*-pNIPAM mit einem Blocklängenverhältnis von 2:1 zeigt beispielsweise keine pH-abhängigen Unterschiede in der Partikelgröße (vgl. Abb. 7-4). Unabhängig vom pH-Wert werden für dieselben Temperaturen ähnliche Partikelgrößen gemessen. Die maximale Partikelgröße wird ebenfalls bei 38 °C beobachtet und beträgt etwa 80-90 nm. Somit unterscheiden sie sich in ihrer Größe kaum von den Blockcopolymeren mit dem Blocklängenverhältnis von 3:1. Dies ist aber auch nicht weiter verwunderlich, da es sich um relativ kurze Peptidblöcke handelt und der Unterschied in der Länge des Peptidblocks nur ca. 20 Aminosäuren beträgt.



**Abb. 7-5** temperaturabhängige Partikelgrößenmessung von PGA-*b*-pNIPAM (3:1 -  $\bar{M}_n$  2.25, links) und PGA-*b*-pNIPAM (3:1 -  $\bar{M}_n$  2.21, glycosyliert DS 0.56, rechts) bei verschiedenen pH-Werten

Vergleicht man diese Ergebnisse nun mit den im Rahmen des Forschungspraktikums von L. THOMAS hergestellten PGA-*b*-pNIPAM Blockcopolymeren (vgl. Abb. 7-5, links), fallen deutliche Unterschiede zu den PLL-*b*-pNIPAM Blockcopolymeren auf. Zwar ist die maximale Größe der Partikel mit 90-110 nm vergleichbar mit der Größe der PLL-*b*-pNIPAM Partikel, eine temperaturabhängige Partikelbildung wird jedoch nicht beobachtet. Bereits bei 22 °C treten Partikel in Lösung auf, deren Größe sich mit steigender Temperatur im Bereich von 22-46 °C nicht maßgeblich verändert. Messungen bei niedrigen pH-Werten waren bei den PGA-*b*-pNIPAM Copolymeren schwierig aufgrund der reduzierten Löslichkeit des PGA-Blocks. Der niedrigste pH-Wert bei dem gemessen werden konnte, ohne dass eine Aggregation oder ein Ausfallen des Blockcopolymers beobachtet wurde, war pH 4.6. Bei diesem pH-Wert wurden die kleinsten Partikelgrößen beobachtet. Wird Glucosylamin an die PGA-*b*-pNIPAM Blockcopolymere angebunden (DS 0.56), werden auch hier über den kompletten Temperaturbereich Partikel beobachtet, deren Größen um ca. 20 nm kleiner sind, als die, der nicht glycosylierten PGA-*b*-pNIPAM Blockcopolymere (vgl. Abb. 7-5, rechts). Ein möglicher Grund für die Abnahme der Partikelgröße durch die Anbindung der Zucker könnte darin liegen, dass dann weniger Carboxylatgruppen im Blockcopolymer vorhanden sind, die sich gegenseitig abstoßen könnten. Nichtsdestotrotz ist es ungewöhnlich, dass bereits bei Temperaturen unterhalb der LCST Partikel beobachtet werden. Die Partikelgrößenmessungen wurden daher mit einer zweiten Charge PGA-*b*-pNIPAM (3:1) wiederholt, die sich wie in Kapitel 7.2 beschrieben von der ersten Charge ( $\bar{M}_w$  2.25) durch eine geringere Dispersität ( $\bar{M}_w/\bar{M}_n$  1.01) auszeichnet. Für dieses Blockcopolymer wurde eine temperaturabhängige Partikelbildung ähnlich wie für die PLL-*b*-pNIPAM Copolymere beobachtet. Exemplarisch ist dies für pH 7 in Abb. 7-6 gezeigt. Die hier beobachtete Partikelgröße liegt zwischen 250-300 nm und ist damit etwa doppelt so groß wie die, der übrigen getesteten Blockcopolymere. Warum die dispersere Probe auch bei niedrigen Temperaturen in der Lage ist Partikel auszubilden, ist ungeklärt. Die Ergebnisse sollten wiederholt und verifiziert werden. Grundsätzlich sollten schonendere Methoden zur Abspaltung der Schutzgruppe am Peptidblock in Betracht gezogen werden, damit keine Kettenbrüche auftreten, die zu dispersen Proben führen. Darüber hinaus sollten umfassendere Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Blocklängen durchgeführt werden, indem sowohl die Größe des pNIPAM-Blockes als auch des Peptidblockes stärker verändert wird.



**Abb. 7-6 Einfluss der Dispersität auf die Partikelbildung von PGA-*b*-pNIPAM (3:1)**

Neben der Partikelgröße wurden noch die Zetapotentiale der Partikel bestimmt, um ihre Stabilität abzuschätzen und um herauszufinden, ob der Peptidblock die Oberflächenladung der Partikel bestimmt. In Tabelle 7-7 sind die gemessenen Zetapotentiale der PGA-*b*-pNIPAM (3:1) Blockcopolymere bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen gezeigt. Die Blockcopolymere mit der Dispersität  $\bar{D} = 2.25$ , die keine signifikante Partikelgrößenänderung mit zunehmender Temperatur zeigten, zeigen auch keine großen Unterschiede im Zetapotentiale zwischen 22 °C und 46 °C. Hier beeinflusst lediglich die Veränderung des pH-Werts die Größe des Zetapotentials. Im neutralen pH-Bereich ist das Zetapotentiale mit ca. -40 mV etwa doppelt so groß wie bei pH 4. Wie bereits in Abschnitt 7.3.1 beschrieben gelten negativ geladenen Partikel mit einem Zetapotentiale unterhalb von - 30 mV als stabil in Lösung. In diesem Fall sind daher die Partikel bei pH 7 stabiler als bei pH 4. Dies liegt sehr wahrscheinlich an der Protonierung der Carboxylatgruppen und der reduzierten Löslichkeit des PGA-Blocks im sauren pH-Bereich, die zu einer Aggregation der Partikel führen kann. Betrachtet man hingegen das Blockcopolymer mit der niedrigeren Dispersität  $\bar{D} = 1.01$ , das eine temperaturabhängige Partikelbildung gezeigt hat, fallen deutliche Unterschiede zum PGA-*b*-pNIPAM mit der höheren Dispersität auf. Bei 22 °C sind die Zetapotentiale der Probe nur etwa halb so groß wie bei 46 °C, während bei der anderen Probe keine Temperaturabhängigkeit beobachtet wurde. Die Temperaturabhängigkeit der Zetapotentiale für diese Probe unterstützt die Resultate der Partikelgrößenmessungen, die Partikel erst für Temperaturen > 36 °C vorhersagen. Bei 22 °C liegen die Polymere nicht als Partikel vor, weshalb die Zetapotentiale nur schwach ausgeprägt sind. Die Werte der Zetapotentiale bei 46 °C sind wiederum von der Größenordnung



vergleichbar mit der disperseren Probe. Im neutralen pH-Bereich werden auch hier die stabilsten Partikel beobachtet.

**Tabelle 7-7 Zetapotentiale der PGA-*b*-pNIPAM (3:1) Blockcopolymere (Mittelwerte aus 3-6 Messungen)**

	pH	Temperatur [°C]	Zetapotential $\zeta$ [mV]
<b>PGA-<i>b</i>-pNIPAM (3:1) - <math>\bar{M}_w</math> 2.25</b>	4	22 °C	-22.9 $\pm$ 0.1
	4	46 °C	-20.8 $\pm$ 0.7
	7	22 °C	-38.9 $\pm$ 0.6
	7	46 °C	-42.7 $\pm$ 1.3
<b>PGA-<i>b</i>-pNIPAM (3:1) - <math>\bar{M}_w</math> 1.01</b>	4.65	22 °C	-12.3 $\pm$ 0.3
	4.65	46 °C	-23.9 $\pm$ 0.7
	7	22 °C	-19.1 $\pm$ 2.1
	7	46 °C	-43.3 $\pm$ 0.8

Die Zetapotentiale der auf Lysin basierenden Blockcopolymere sind in Tabelle 7-8 gezeigt. Anders als die auf PGA basierenden Blockcopolymere sind die Zetapotentiale positiv. Da PLL ein Polykation ist und über  $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ -Gruppen verfügt, wurden für die PLL-Blockcopolymere auch positive Oberflächenladungen erwartet. Während auf PGA basierende Blockcopolymere aufgrund der negativ geladenen Carboxylatgruppen eine negative Oberflächenladung zeigen. Die höchsten Zetapotentiale für die PLL-Blockcopolymere werden bei 46 °C beobachtet. Die PLL-Blockcopolymere bilden anders als die auf PGA basierenden Blockcopolymere sowohl bei pH 3 als auch bei pH 7 stabile Partikel bei 46 °C aus ( $\zeta > 30$  mV).

**Tabelle 7-8 Zetapotentiale der PLL-*b*-pNIPAM Blockcopolymere (Mittelwerte aus 3-4 Messungen)**

	pH	Temperatur [°C]	Zetapotential $\zeta$ [mV]
<b>PLL-<i>b</i>-pNIPAM (1:1) - <math>\bar{M}_n</math> 1.01</b>	3	22 °C	+7.2 $\pm$ 0.8
	3	46 °C	+31.3 $\pm$ 1.1
	7	22 °C	+9.5 $\pm$ 3.4
	7	46 °C	+29.6 $\pm$ 1.2
<b>PLL-<i>b</i>-pNIPAM (2:1) - <math>\bar{M}_n</math> 1.01</b>	3	22 °C	+16.1 $\pm$ 0.6
	3	46 °C	+31.9 $\pm$ 2.6
	7	22 °C	+15.5 $\pm$ 0.8
	7	46 °C	+34.5 $\pm$ 2.5

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass polypeptidhaltige Blockcopolymere mit pNIPAM als zweiten Block hergestellt werden konnten und diese in der Lage sind temperaturabhängig Partikel auszubilden. Besteht der Peptidblock aus Poly-L-lysin werden Partikel mit positiven Zetapotential erhalten, besteht er hingegen aus Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure werden Partikel mit negativem Zetapotential erhalten. Es sollten genauere Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Dispersität der Proben und der Anbindung von Zuckern folgen. Darüber hinaus wäre es interessant, genauer zu untersuchen, inwiefern die Glycosylierung der Blockcopolymere die Partikelgrößen und Zetapotentiale beeinflusst und ob sich Unterschiede in der Lektin-Wechselwirkung zwischen den untersuchten Glycopolypeptiden und den glycosylierten Blockcopolymeren zeigen.

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

Bisher gab es keine systematischen Untersuchungen dazu in wie weit größere Zuckerreste an Glycopolyeptiden die Sekundärstrukturen und die Wechselwirkungen mit Lektinen beeinflussen. Vor allem für das Verständnis biologischer Wechselwirkungen und späteren Anwendungen im pharmazeutischen Bereich ist dies jedoch von großem Interesse. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine einfache Synthese für wohldefinierte Glycopolyeptide, die mit verschiedenen Di- und Trisacchariden funktionalisiert sind, zu entwickeln und den Einfluss der Zuckerdichte auf die Sekundärstrukturen und die Wechselwirkungen mit Modell-Lektinen zu untersuchen.

Für die Synthese der Glycopolyeptide wurde der Ansatz der polymeranalogen Modifizierung gewählt. Hierfür wurde zunächst das Polypeptidrückgrat (Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure) über amin-initiierte, ringöffnende Polymerisation von *N*-Carboxyanhydriden hergestellt. An das Polypeptidrückgrat wurden verschiedene Aminozucker mit dem Amidkupplungsreagenz 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinchlorid (DMT-MM) angebunden. Die Aminozucker wurden im Vorfeld über KOCHETKOV-Aminierung hergestellt und konnten direkt ohne den Einsatz von Schutzgruppen verwendet werden. Über die polymeranaloge Modifizierung mit DMT-MM konnten verschiedenen auf Glucose basierende Mono-, Di- und Trisaccharide in wässriger Lösung an Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure angebunden und der Glycosylierungsgrad über einen breiten Bereich eingestellt werden (0-80 %). Darüber hinaus wurde auch Glucose über einen aromatischen Spacer ( $C_{ar}$ -Glucose) an das Peptidrückgrat angebunden. Hierbei konnte eine nahezu vollständige Substitution erzielt werden, die wahrscheinlich darauf beruht, dass sowohl das DMT-MM als auch der Spacer bei höheren Substitutionsgraden bevorzugt angelagert werden ( $\pi$ -Stacking).

Von den hergestellten Glycopolyeptiden wurden pH-abhängige Sekundärstrukturuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie durchgeführt. Für alle hergestellten Glycopolyeptide zeigten sich pH-abhängige Helix-Knäul-Übergänge. Im neutralen pH-Bereich lagen die Glycopolyeptide ungeordnet vor, während sie im sauren pH-Bereich helikale Strukturen ausbilden konnten. Die maximale Helizität, die im sauren pH-Bereich erreicht werden konnte, hing dabei maßgeblich vom Glycosylierungsgrad ab. Umso mehr Zucker an das Glycopolyeptid angebunden wurden, desto geringer war die Helizität und zu desto niedrigeren pH-Werten war der Helix-Knäul-Übergang verschoben. Für sehr hohe Glycosylierungsgrade ( $\geq 80\%$ )

wurde kein oder nur ein sehr schwacher Übergang beobachtet. Die Größe des Zuckerrestes hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur. Für ähnliche Glycosylierungsgrade wurden auch ähnliche Helizitäten beobachtet, unabhängig davon, ob es sich um Mono-, Di- oder Trisaccharide handelte. Eine Ursache für die Abnahme der Helizität mit zunehmendem Glycosylierungsgrad kann in der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen der Zucker und dem Peptidrückgrat liegen. Hierdurch kann die Ausbildung der Helix, die ebenfalls über Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt, gestört werden. Da alle verwendeten Zucker über eine Glucose-Einheit angebunden sind, ist die unmittelbare Umgebung am Peptidrückgrat für alle verwendeten Zucker identisch. Aus diesem Grund ist es nicht weiter verwunderlich, dass für ähnliche Glycosylierungsgrade auch ähnliche Helizitäten erhalten werden.

Die Polypeptide mit dem aromatischen Spacer zeigten für niedrige Substitutionsgrade ein ähnliches Verhalten wie die übrigen Glycopolypeptide. Für höhere Substitutionsgrade ( $\geq 76\%$ ) konnten jedoch auch im neutralen pH-Bereich helikale Strukturen beobachtet werden. Das Ausmaß der Helizität hing dabei vor allem vom Polymerisationsgrad ab. Für höhere Polymerisationsgrade (DP 100) konnten pH-unabhängig Helizitäten von ca. 80 % erreicht werden. Dies ist vergleichbar mit unfunktionalisierter Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure desselben Polymerisationsgrades im sauren pH-Bereich. Die Helix-fördernde Wirkung des aromatischen Spacers lässt sich zum einen über die Abschirmung der Hydroxylgruppen der Zucker erklären. Zum anderen können bei hohen Substitutionsgraden  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten auftreten, die die Ausbildung der Helix stabilisieren können.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung der Wechselwirkungen der synthetisierten Glycopolypeptide mit zuckerbindenden Proteinen (Lektinen). Als Modell-Lektin wurde Concanavalin A verwendet, da dieses in der Lage ist endständige Glucose zu binden. Durch quantitative Fällungstest und Isotherme Titrationskalorimetrie konnte gezeigt werden, dass ein bestimmter Glycosylierungsgrad erforderlich ist, um eine gute Interaktion mit dem Lektin zu ermöglichen. Eine weitere Steigerung des Glycosylierungsgrades über diesen Mindestwert hinaus, führte zu keiner zusätzlichen Verbesserung der Affinitäten. Allgemein zeigten sich für die Glycopolypeptide mit Di- und Trisacchariden stärkere Wechselwirkungen, als für Glycopolypeptide, die mit dem Monosaccharid funktionalisiert waren. Eine Vergrößerung des Abstandes der endständigen Glucose-Einheit vom Polypeptidrückgrat

durch den aromatischen Spacer konnte die Wechselwirkung mit dem Lektin ebenfalls positiv beeinflussen. Unklar ist hierbei, ob die Verbesserung der Interaktion allein auf den Abstand des Zuckers vom Peptidrückgrat zurück zu führen ist, oder ob die teilweise helikalen Strukturen bei neutralem pH-Wert genauso dazu beitragen. Um dies herauszufinden, sollten die Versuche zur Lektinwechselwirkung mit racemischer Polyglutaminsäure wiederholt werden. Diese ist nicht in der Lage Sekundärstrukturen auszubilden und kann somit zur Klärung des Einflusses helikaler Strukturen herangezogen werden.

Für einen späteren biomedizinischen Nutzen der Glycopolyptide ist nicht nur die Stärke der Wechselwirkungen mit Lektinen von Bedeutung, sondern vor allem die Möglichkeit komplexere Strukturen zu generieren, die beispielsweise die Einlagerung von Wirkstoffen ermöglichen. Eine Möglichkeit hierfür stellt die Synthese von Blockcopolymeren dar. In dieser Arbeit wurden erste Versuche für die Entwicklung schaltbarer Materialien auf Glycopolyptid-Basis durchgeführt. Es wurden Blockcopolymere aus Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure bzw. Poly- $\alpha$ ,L-lysin und thermoresponsivem Poly-N-isopropylacrylamid (pNIPAM) hergestellt, die in der Lage waren temperaturabhängig nanopartikuläre Strukturen in Lösung auszubilden. Durch dynamische Lichtstreu- und Zetapotentialmessungen konnte gezeigt werden, dass sich oberhalb von 34 °C - je nach pH-Wert und Peptidblocklänge - Partikel mit einer Größe von 80-250 nm ausbildeten. Das Vorzeichen der Oberflächenladung war dabei abhängig vom gewählten Peptidblock (positiv: Poly- $\alpha$ ,L-lysin, negativ: Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure), was darauf hindeutet, dass sich der Peptidblock außen und der pNIPAM-Block im Inneren der Partikel befindet. Ungeklärt ist bisher der Einfluss der verschiedenen Zucker auf die Partikelbildung. Interessant wäre vor allem der Einfluss des aromatischen Spacers, da in diesem Fall der Polypeptidblock auch im neutralen pH-Bereich helikal vorliegen kann. Darüber hinaus sollte mit Bindungsstudien untersucht werden, inwiefern die Ausbildung nanopartikulärer Strukturen im Falle der Blockcopolymere die Lektin Wechselwirkungen beeinflusst. Weiterhin könnten die Einlagerung und Freisetzung von Wirkstoffen aus den Blockcopolymer Nanopartikeln untersucht werden.

Für zukünftige biomedizinische Anwendungen wären auch Untersuchungen zur Biokompatibilität und Abbaubarkeit der Glycopolyptide interessant, sowie Bindungsstudien mit medizinisch relevanten Lektinen. Eine zusätzliche Weiterentwicklung des Systems könnte in der Einführung weiterer Funktionalitäten, wie die Konjugation mit Wirkstoffen oder die Einbrin-

gung von funktionellen Gruppen zur Anbindung an Oberflächen, darstellen. So könnten beispielsweise entweder über den Initiator oder über die Seitenketten Phosphonat- oder Thiolgruppen in die Glycopolypeptide eingebracht werden, um diese auf Titan- oder Goldoberflächen anzubinden. Die immobilisierten Glycopolypeptide könnten dann beispielsweise Anwendung in der Gewebezüchtung (*tissue engineering*) finden.

## 9 Experimenteller Teil

### 9.1 Materialien

Tabelle 9-1 Verwendete Chemikalien mit Angabe von Reinheit und Hersteller

Substanz	Reinheit	Hersteller	CAS-Nummer
$\alpha$ -D-Glucose	96 %	Sigma-Aldrich	492-62-6
$\alpha$ -Pinen	98 %	Sigma-Aldrich	80-56-8
$\gamma$ -Benzyl-L-glutamat-N-carboxyanhydrid (BLG-NCA)	$\geq 98$ %	Isochem / Iris Biotech	3190-71-4
Ammoniumcarbonat	$\geq 30$ %	Roth	506-87-6
Ammoniumhydroxid-Lösung	25 %	Sigma-Aldrich	1336-21-6
N <sub>6</sub> -Benzyloxycarbonyl-L-lysin (H-Lys(Z)-OH)	99 %	Sigma-Aldrich	1155-64-2
Bromwasserstoff-Lösung (33 %-ig in Essigsäure)	-	Sigma-Aldrich	10035-10-6
Calciumchlorid	80 %	VWR	10043-52-4
Concanavalin A (ConA), Typ IV, lyophilisiertes Pulver	$\geq 95$ %	Sigma-Aldrich	11028-71-0
D-(+)-Cellobiose	$\geq 98$ %	Alfa Aesar	528-50-7
N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA)	$\geq 99$ %	Sigma-Aldrich	7087-68-5
D-(+)-Maltobiose Monohydrat	$\geq 99$ %	Sigma-Aldrich	6363-53-7
D-(+)-Mannose	99 %	Sigma-Aldrich	3458-28-4
D-Lactose Monohydrat	99.5 %	Sigma-Aldrich	64044-51-5
DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure, Na-Salz)	97 %	Sigma-Aldrich	2039-96-5
DMT-MM (4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinchlorid)	$\geq 96$ %	Sigma-Aldrich	3945-69-5
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	99 %	VWR	10028-24-7
Essigsäureanhydrid	$\geq 99$ %	Sigma-Aldrich	108-24-7
4-(F <sub>moc</sub> -aminomethyl)benzoesäure	$\geq 95$ %	ChemPUR	164470-64-8
HBTU (N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium Hexafluorophosphat)	$\geq 99$ %	ChemPUR	94790-37-1
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	99.5 %	Sigma-Aldrich	7365-45-9
n-Hexylamin	99 %	Sigma-Aldrich	111-26-2
Lithiumbromid	99 %	Roth	7550-35-8
Magnesiumchlorid Hexahydrat	$\geq 99$ %	Roth	7791-18-6
Maltotriose	$\geq 97$ %	TCI Chemicals	3371-50-4
Manganchlorid Tetrahydrat	$\geq 99$ %	Sigma-Aldrich	13446-34-9
Natriumazid	99 %	ChemPUR	26628-22-8

Substanz	Reinheit	Hersteller	CAS-Nummer
Natriumchlorid	99.5 %	Roth	7647-14-5
Natriumhydrogencarbonat	≥ 99 %	Roth	144-55-8
Natriumhydroxid	≥ 99 %	Roth	1310-73-2
Phosphatpuffer pH 7.2		Sigma-Aldrich	
Piperidin	≥ 99.5 %	Sigma-Aldrich	110-89-4
Poly( <i>N</i> -isopropylacrylamid) amin-terminiert	M <sub>n</sub> 2,500	Sigma-Aldrich	
Salzsäure, konzentriert	p.a.	Sigma-Aldrich	7647-01-0
Triphosgen	98 %	Sigma-Aldrich	32315-10-9

Tabelle 9-2 Verwendete Lösemittel mit Angabe von Reinheit und Hersteller

Lösemittel	Reinheit	Hersteller	CAS-Nummer
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	HPLC	VWR	67-66-3
Chloroform, deuteriert	99.8 %	Roth	865-49-6
Deuteriumoxid (D <sub>2</sub> O)	99.9 %	Deutero	7789-20-0
Diethylether	p.a.	VWR/Fisher	60-29-7
<i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF)	HPLC	VWR	68-12-2
Dimethylsulfoxid (DMSO)	99.7 %	Acros	67-68-5
Dimethylsulfoxid, deuteriert (DMSO-d <sub>6</sub> )	99.96 %	Sigma-Aldrich	2206-27-1
Ethylacetat	HPLC	VWR	141-78-6
<i>n</i> -Heptan	HPLC	Alfa Aesar	142-82-5
Methanol	p.a.	VWR/Fisher	67-56-1
Tetrahydrofuran (THF)	HPLC	Roth/VWR	109-99-9
Tetramethylsilan	99.5 %	Sigma-Aldrich	75-76-3
Trifluoressigsäure (TFA)	99 %	Sigma-Aldrich	76-05-1
Trifluoressigsäure, deuteriert (TFA-d)	99.5 %	Sigma-Aldrich	599-00-8

DMF und THF wurden mittels einer Lösungsmitteltrocknungsanlage (SPS-800, MBraun) getrocknet. Ethylacetat und Methanol wurden über Molekularsieb (4 Å bzw. 3 Å) getrocknet und gelagert. Alle übrigen Lösungsmittel wurden direkt verwendet, wie sie erhalten wurden.

Zur Aufreinigung der hergestellten Polypeptide und Glycopolypeptide wurden Dialysemembranen aus regenerierter Cellulose mit einem „molecular weight cut off“ (MWCO) von 3,500 g/mol der Firma Spectrum verwendet (Spectra/Por 3).



## 9.2 Methoden

### NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Spektren wurden von der NMR-Abteilung der Chemischen Institute der TU Braunschweig gemessen. Die  $^1\text{H}$ -NMR Spektren wurden an einem BRUKER AV III-400, einem BRUKER DRX-400 (jeweils bei 400 MHz) oder einem BRUKER AV II-600 (bei 600 MHz) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ , TFA-d und  $\text{D}_2\text{O}$  verwendet. Für die organischen Lösungsmittel wurde als interner Standard Trimethylsilan (TMS) verwendet. Wässrigen Proben wurde 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure Natrium-Salz (DSS) zugesetzt. Die Probenkonzentration der  $^1\text{H}$ -NMR Spektren betrug für Polymere ca. 20 mg auf 0.7 mL Lösungsmittel und für nicht polymere Verbindungen ca. 12 mg je 0.7 mL.

Über die  $^1\text{H}$ -NMR Spektren wurde der Polymerisationsgrad der hergestellten PGA-Na's berechnet. Hierfür wurden die Integralverhältnisse der Endgruppensignale des verwendeten Initiators *n*-Hexylamin ins Verhältnis zum Integral des Signals der Methingruppe des Polypeptidrückgrats gesetzt. Diese Methode eignet sich nur für kurzkettige Polymere ( $\text{DP} \leq 100$ ) mit enger Molekulargewichtsverteilung. Für größere Polymerisationsgrade wird das Signal der Endgruppe zu schwach für eine Auswertung.

Außerdem wurde über die  $^1\text{H}$ -NMR Spektren der Glycosylierungsgrad der Glycopolypeptide bestimmt, indem das Integralverhältnis des Signals der Methingruppe des Polypeptidrückgrats ins Verhältnis zu Signalen der angebundenen Zucker gesetzt wurde.

### FTIR-Spektroskopie

Alle FTIR-Spektren wurden an einem Equinox IFS 55 Spektrometer der Firma BRUKER in einem Bereich von  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  gemessen. Die Proben wurden hierbei in der Regel als Reinstoffe mittels ATR-Einheit gemessen. In seltenen Fällen wurden KBr-Plättchen vermessen. Als Referenz zur Messung des Hintergrunds wurde dann reines KBr verwendet. Die Auswertung der Spektren erfolgt mit der zugehörigen Opus-Software.

### Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden durch das Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig an einem Flash EA 1112 der Firma THERMO QUEST ITALIA S.P.A. aufgenommen.

### Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Molekulargewichtsverteilungen der hergestellten Peptide wurden mittels GPC bestimmt. Hierfür standen zwei Anlagen zur Verfügung, die jeweils aus einem Lösungsmittelreservoir, Online-Entgaser, HPLC-Pumpe, manuellem RHEODYNE Injektor, einem temperierten Säulenofen, einem Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor (MALLS) sowie einem Brechungsindexdetektor bestehen. Die Aufnahme der Messdaten und Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die WinGPC Unichromsoftware (Version 8.1) der Firma PSS.

Die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung des Ausgangspolypeptids PBLG, sowie der Blockcopolymere PBLG-*b*-pNIPAM und PZLL-*b*-pNIPAM, erfolgte auf der DMF-GPC unter den in Tabelle 9-4 gezeigten Bedingungen. Die anionischen, wasserlöslichen Polypeptide (PGA-Na, die Glycopolypeptide sowie die PGA-Na-*b*-pNIPAM Blockcopolymere) wurden auf der wässrigen GPC unter den in Tabelle 9-5 gezeigten Bedingungen vermessen. Für die kationischen Polypeptide (Poly-L-lysin und PLL-*b*-pNIPAM) wurden die in Tabelle 9-6 gezeigten Messbedingungen verwendet. Die GPC-Messungen liefern als Ergebnis das Zahlenmittel  $M_n$  und das Gewichtsmittel  $M_w$  der Molekulargewichtsverteilung. Aus beiden ergibt sich die Dispersität  $\mathfrak{D}$  ( $\mathfrak{D} = M_w/M_n$ ) der Probe, die ein Maß für die Breite der Molekulargewichtsverteilung ist. Die in der Arbeit gezeigten Werte stellen Mittelwerte von 3-4 Einzelmessungen für jedes Polypeptid dar. Der mittlere Polymerisationsgrad  $P_n$  wurde aus dem Zahlenmittel  $M_n$  und dem Molekulargewicht der Wiederholungseinheit bestimmt (s. Gleichung 9-1).

$$P_n = \frac{M_n}{M} \quad (9-1)$$

Die Bestimmung der Molekulargewichte erfolgte über Doppeldetektion mit einem Konzentrationsdetektor (RI) und einem Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor (MALLS). Auf diese Weise ist es möglich, bei Kenntnis der jeweiligen Brechungsindexinkremente ( $dn/dc$ ) der Proben, das Molekulargewicht absolut zu bestimmen (Methode: „Faktor· $dn/dc$ “). Auf eine konventionelle Kalibrierung mit Polymerstandards kann verzichtet werden. Die Brechungsindexinkremente der Polypeptide finden sich in Tabelle 9-3.

Für die glycosylierten Polypeptide wurden keine  $dn/dc$ -Werte bestimmt, da diese für jeden Substitutionsgrad und jeden Zucker einzeln hätten bestimmt werden müssen und der Materialaufwand mit ca. 50 mg sehr hoch ist. Alternativ lässt sich das Molekulargewicht der Gly-

copolyptide aus dem Polymerisationsgrad des Rückgrats (PGA-Na) und dem mittleren Molekulargewicht einer Aminosäureeinheit  $M_{MRW}$ <sup>17</sup> bestimmen (s. Gleichung 9-2).

$$M_n(\text{Glycopolyptid}) = P_n(\text{Polyptid}) \cdot M_{MRW} \quad (9-2)$$

Für die Blockcopolymere wurde die Methode „Faktor·Konz.“ zur Bestimmung des Molekulargewichts in der WinGPC Software verwendet. Voraussetzung hierfür ist, dass die Probenkonzentration sehr genau eingestellt wurde und der Brechungsindexdetektor mit einem Standard bekannten dn/dc-Werts kalibriert wurde (Gerätefaktor). Aus dem Gerätefaktor und der als bekannt vorausgesetzten Probenkonzentration lässt sich der dn/dc-Wert der Probe berechnen. Dieser Wert wird dann für die Bestimmung des Molekulargewichts herangezogen.

**Tabelle 9-3 Brechungsindex-Inkrementen der hergestellten Polypeptide**

Polypeptid	Eluent	Temp.	dn/dc
PBLG	DMF + LiBr (0.1 M)	45 °C	0.122
PGA-Na	Phosphat-Puffer (0.02 M) + NaCl (0.1 M) + NaN <sub>3</sub> (0.05 %), pH 7.4	35 °C	0.179
PZLL	DMF + LiBr (0.1 M)	45 °C	0.123

**Tabelle 9-4 Technische Daten und Messbedingungen der DMF-GPC**

<b>Eluent</b>	DMF + LiBr (0.1 M) membranfiltriert (0.2 µm)
<b>Säulensatz</b>	PSS GRAM, 1x Vorsäule 10 µm; 2x 1000 Å Trennsäulen (10 µm)
<b>Temperatur</b>	60 °C
<b>Flussrate</b>	0.5 mL/min
<b>Injektionsvolumen</b>	100 µL
<b>Probenkonzentration</b>	2 mg/mL
<b>RI-Detektor</b>	SHODEX RI-101, 45 °C
<b>MALLS-Detektor</b>	WYATT MiniDawn Tristar (3 Winkel)
<b>HPLC-Pumpe</b>	SDS SCHAMBECK 9404

<sup>17</sup> Zugänglich über den mittels <sup>1</sup>H-NMR bestimmten Glycosylierungsgrad

Tabelle 9-5 Technische Daten und Messbedingungen der H<sub>2</sub>O-GPC für neutrale und anionische Proben

<b>Eluent</b>	Phosphat-Puffer (0.02 M) + NaCl (0.1 M) + NaN <sub>3</sub> (0.05 wt-%) – pH 7.4 (membranfiltriert 0.2 µm)
<b>Säulensatz</b>	PSS Suprema, 1x Vorsäule 10 µm, 1x 100 Å Trennsäule (10 µm), 1x 10.000 Å Trennsäule (10 µm)
<b>Temperatur</b>	40 °C
<b>Flussrate</b>	1.0 mL/min
<b>Injektionsvolumen</b>	100 µL
<b>Probenkonzentration</b>	2 mg/mL
<b>RI-Detektor</b>	SHODEX RI-101, 35 °C
<b>MALLS-Detektor</b>	WYATT Dawn DSP (18 Winkel)
<b>HPLC-Pumpe</b>	MERCK Hitachi L-6000-A

Tabelle 9-6 Technische Daten und Messbedingungen der H<sub>2</sub>O-GPC für kationische Proben

<b>Eluent</b>	NaCl (0.1 M) + TFA (0.1 wt-%), pH 2.3
<b>Säulensatz</b>	PSS Novema, 1x Vorsäule 10 µm, 1x 1000 Å Trennsäule (10 µm), 1x 30 Å Trennsäule (10 µm)
<b>Temperatur</b>	40 °C
<b>Flussrate</b>	1.0 mL/min
<b>Injektionsvolumen</b>	100 µL
<b>Probenkonzentration</b>	2 mg/mL
<b>RI-Detektor</b>	SHODEX RI-101, 35 °C
<b>MALLS-Detektor</b>	WYATT Dawn DSP (18 Winkel)
<b>HPLC-Pumpe</b>	MERCK Hitachi L-6000-A

## CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden am Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig an einem JASCO J-175 Spektropolarimeter aufgenommen. Hierfür wurden die Polypeptide mit einer Konzentration von 0.2 mg/mL in 0.01 M NaCl-Lösung gelöst und in einer SUPRASIL Quarzküvette (0.1 cm Lichtweg) bei Raumtemperatur im Wellenlängenbereich von 250-190 nm vermessen. Die gezeigten Spektren stellen einen Mittelwert aus 5 Einzelmessungen dar. Das resultierende Spektrum wurde anschließend, um das Spektrum des reinen Lösungsmittels korrigiert und mit einem Savitzky-Golay-Filter geglättet. Die molare Elliptizität der Polypeptide wird dann, wie in Kapitel 5 beschrieben, über (5-4) unter Zuhilfenahme des mittleren Molekulargewichts einer Aminosäureeinheit  $M_{MRW}$  berechnet. Für reine PGA-Na entspricht  $M_{MRW}$  der Monomereinheit. Für Glycopolypeptide wird  $M_{MRW}$  über den aus dem  $^1\text{H-NMR}$  erhaltenen Substitutionsgrad berechnet. Aus der molaren Elliptizität kann dann die Helizität der Polypeptide über (5-7) berechnet werden.

Zur Bestimmung des Helix-Knäul-Übergangs wurde eine pH Titration mit einem MPT-2 Multi Purpose Titrator der Firma MALVERN durchgeführt. Es wurde eine Stammlösung des Polypeptids (0.2 mg/mL in 0.01 M NaCl-Lösung) hergestellt und der pH-Wert mit wässriger HCl-Lösung (1 M und 0.1 M) eingestellt. Im Bereich von pH 2.5-7 wurden in 0.5er Schritten die pH-Werte eingestellt und jeweils 1 mL für die CD-Messungen entnommen.

## Quantitative Präzipitation

Alle Versuche zur Lektin Wechselwirkung wurden in HEPES gepufferter Salzlösung (HBS) pH 7.4 mit Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen durchgeführt. Für die quantitativen Fällungstests wurde eine 20  $\mu\text{M}$  Concanavalin A Stammlösung in HBS-Puffer hergestellt. Von den Polypeptiden wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 100  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 0.2  $\mu\text{M}$ . In 1.5 mL Eppendorf-Tubes wurden jeweils 250  $\mu\text{L}$  der ConA-Stammlösung mit 250  $\mu\text{L}$  einer Polypeptid-Lösung zusammen gegeben und mit Hilfe eines Vortexers vermischt. Die Reaktionsansätze wurden für 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen und an einem JASCO V-630 UV/Vis Spektrophotometer mit einer Ultra-Mikro-Küvette aus Quarzglas (1 cm Lichtweg) gegen HBS-Puffer als Referenz vermessen. Das Präzipitat wurde 3x mit jeweils 500  $\mu\text{L}$  HBS-Puffer gewaschen (vortexen und abzentrifugieren) und anschließend in 500  $\mu\text{L}$  200 mM  $\alpha$ -D-Mannose oder  $\alpha$ -D-Maltobiose-Lösung in HBS-Puffer gelöst. Das gelöste Präzipitat wurde ebenfalls am UV/Vis Spektrophotometer vermessen. Als Referenz wurde hier 200 mM  $\alpha$ -D-Mannose- bzw.  $\alpha$ -D-Maltobiose-Lösung in HBS-Puffer verwendet. Es wurden jeweils im Bereich von 340-220 nm die Absorbanzen gemessen. Der Anteil an Concanavalin A im Überstand und im Präzipitat wurde über eine Kalibrierung mit Concanavalin A bei 280 nm ermittelt (vgl. Kapitel 6.1) Die Messbedingungen finden sich in Tabelle 9-7.

**Tabelle 9-7 Messbedingungen – quantitative Präzipitation**

<b>Wellenlängenbereich</b>	340-220 nm
<b>Temperatur</b>	Raumtemperatur
<b>Betriebsmodus</b>	kontinuierlich
<b>UV/Vis Bandbreite</b>	1.5 nm
<b>Datenintervall</b>	0.5 nm
<b>Scan-Geschwindigkeit</b>	100 nm/min
<b>Lichtquelle</b>	Deuteriumlampe (190-350 nm)
<b>Software</b>	JASCO Spectra Manager Version 2.03.00 JASCO Spectra Analysis Version 2.09.05

### Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die ITC-Messungen wurden am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in der Abteilung Strukturbiologie in Braunschweig an einem Microcal VP-ITC Gerät der Firma MALVERN durchgeführt. Als Messprogramm wurde „vpviewer2000“ von MicroCal LLC genutzt. Die Messungen erfolgten unter den in Tabelle 9-8 gezeigten Messbedingungen. Für die jeweils erste Injektion wurde ein Injektionsvolumen von 2  $\mu\text{L}$  mit einer Injektionsdauer von 4 s verwendet und für die spätere Auswertung verworfen, da es durch das Einführen der Spritze zu geringfügigen Vermischungen zwischen Ligand und Bindungspartner und somit zu einer Verfälschung des Ergebnis kommt.

**Tabelle 9-8 Messbedingungen - ITC**

<b>Gesamt Injektionen</b>	30
<b>Zelltemperatur</b>	25 °C
<b>Bezugsleistung</b>	10 $\mu\text{cal/s}$
<b>Initiale Verzögerung</b>	60 s
<b>Injektionsvolumen</b>	10 $\mu\text{L}$
<b>Injektionsdauer</b>	20 s
<b>Abstand zwischen den Injektionen</b>	350-600 s
<b>Filler Period</b>	2 s
<b>Rührgeschwindigkeit</b>	307 rpm
<b>Puffer</b>	HBS pH 7.4
<b>Spritzenkonzentration</b>	20-75 $\mu\text{M}$
<b>Zellkonzentration</b>	50-200 $\mu\text{M}$

Vor der ersten Messung wurde die Referenzzelle mit frischem, entgasten Millipore-Wasser gespült und befüllt. Die Messzelle wurde vor jeder Messung über eine Vakuum-Ansaugung mit mindestens 500 mL Millipore-Wasser gespült. Anschließend wurde die Messzelle noch 3x manuell mit HBS Puffer gespült und für mindestens 5 min stehen gelassen. Die Messzelle wurde entleert und mit der zuvor entgasten Concanavalin A Lösung (1.4 mL) befüllt. Die Mess- und Referenzzelle wurden auf 24 °C vortemperiert, während die Spritze mit Millipore-Wasser und Puffer gespült und letztlich mit der Polymerlösung befüllt wurde. Überschüssige Polymerlösung außen an der Injektionsnadel wurde vorsichtig mit einem Kimtech-Tuch ent-

fernt. Anschließend wurde die Injektionsnadel in die Messzelle eingebracht und die Messung unter den in Tabelle 9-8 gezeigten Bedingungen gestartet. Nach Abschluss der Messung wurde die Injektionsnadel entfernt, entleert und gründlich gespült. Die Messzelle wurde ebenfalls mittels einer Spritze geleert und mit 200 mM  $\alpha$ -D-Maltobiose Lösung befüllt, um gegebenenfalls Reste des Präzipitats zu entfernen. Nach 5 min wurde die Maltobiose-Lösung entfernt und die Messzelle mit HBS-Puffer und Millipore gereinigt.

Die Auswertung der ITC-Messungen erfolgt über die freizugängliche Software NITPIC (Version 1.0.4b)<sup>18</sup> und SEDPHAT (Version 12.1b)<sup>19</sup>. Detaillierte Informationen über die von der Software verwendeten Algorithmen finden sich in der Literatur. <sup>[152, 153]</sup> Die grafische Darstellung der ITC-Daten erfolgte mit der Software GUSSI (Version 1.0.8e), einem Programm, das den Output von SEDPHAT illustrieren kann.

### **Dynamische Lichtstreuung**

Die Partikelgrößen- und Zetapotential-Messungen erfolgten an einem Zetasizer Nano ZS der Firma MALVERN mit der entsprechenden Zetasizer Software Version 7.03. Für die Partikelgrößenmessungen wurden Einwegküvetten aus Polystyrol (DTS0012) verwendet. Die Zetapotential-Messungen erfolgten mit speziellen Einwegzellen (DTS1060) von MALVERN.

Alle Messungen wurden in 0.01 M NaCl-Lösung durchgeführt und der pH-Wert der Lösungen wurde mit wässriger HCl- bzw. NaOH-Lösung eingestellt. Die Probenkonzentration betrug 4 mg/mL. Alle Proben wurden bevor sie vermessen wurden filtriert (0.22  $\mu$ m).

Die Partikelgröße wurde von 22 °C bis 46 °C in 2 °C Intervallen gemessen. Für jede Temperatur wurden 3 Messungen á 30 Einzelmessungen durchgeführt. Die Equilibrierungsdauer nach jeder Temperaturstufe betrug 120 s.

Für die Zetapotential-Messungen wurden dieselben Proben verwendet, wie für die Partikelgrößenmessungen. Die Messungen erfolgten bei 22 °C und 46 °C. Von jeder Probe wurden mindestens 3 Werte á 30 Einzelmessungen gemessen und der Mittelwert bestimmt.

---

<sup>18</sup> Software-Copyright: The University of Texas Southwestern Medical Center

<sup>19</sup> Peter Schuck – National Institute of Health, Bethesda, MD 20892, USA



### 9.3 Synthese der Aminosucker

Die Aminosucker wurden nach einer modifizierten Literaturvorschrift mittels KOCHETKOV-Aminierung nach YADAVALLI und ZHANG hergestellt.<sup>[117]</sup>

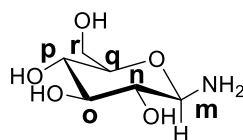
#### 9.3.1 $\beta$ -D-Glucosylamin

2.05 g  $\alpha$ -D-Glucose (11.4 mmol, 1 eq.) wurde in 200 mL gesättigter Ammoniumcarbonat-Lösung gelöst. Anschließend wurde festes Ammoniumcarbonat  $((\text{NH}_4)_2\text{CO}_3)$  zugegeben, sodass ein leichter Bodensatz vorhanden war. Die Reaktionsmischung wurde für 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass immer ein Bodensatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  vorhanden war. Wenn sich der Bodensatz mit der Zeit reduziert hat, wurde etwas Ammoniumcarbonat nachdosiert, sodass wieder ein leichter Bodensatz vorhanden war. Nach 5 Tagen wurde das Wasser im Hochvakuum entfernt und der Rückstand trocken gezogen. Zu dem Rückstand wurden 200 mL über Molekularsieb ( $3 \text{ \AA}$ ) getrocknetes HPLC-Methanol gegeben. Das Gemisch wurde bei  $65^\circ\text{C}$  solange refluxiert bis sich der Rückstand vollständig gelöst hat und die Gasentwicklung (Blasenzähler) zum Erliegen gekommen ist. Die Reaktionslösung wurde anschließend filtriert und das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde am Hochvakuum getrocknet.

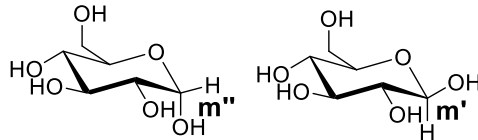
**Ausbeute:** 2.02 g (11.3 mmol, 99 %), weißer, kristalliner Feststoff

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, RT,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] 5.22 (d, 0.02 H,  $m'$  – Edukt ( $\beta$ )); 4.63 (d, 0.03 H,  $m''$  – Edukt ( $\alpha$ )); 4.28 (d, 0.15 H,  $m^*$  – Dimer (Nebenprodukt)); 4.08 (d, 0.7 H,  $m$  – Produkt ( $\beta$ )); 3.89-3.11 (m, 6 H, n-r, Gerüstprotonen) (vgl. Anhang 3)

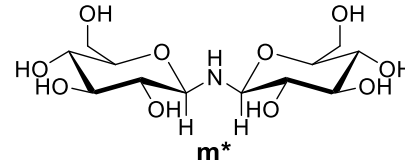
**Glucosylamin**



**$\alpha$ -D-Glucose /  $\beta$ -D-Glucose**



**Di- $\beta$ -D-Glucosylamin**



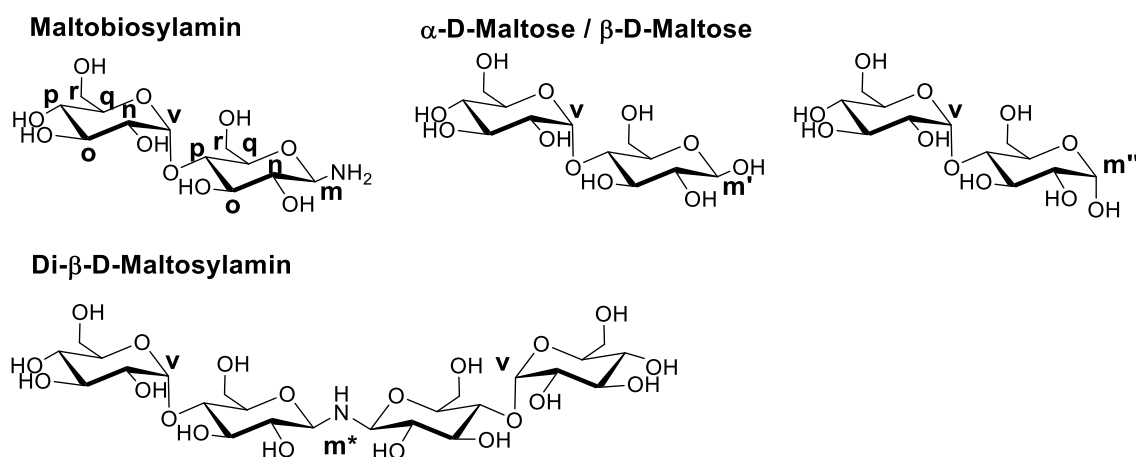
**FTIR** (ATR):  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] 3282 (N-H-Valenz / O-H-Valenz); 2890 (C-H-Valenz); 1616 (N-H-Deformation); 1417 (OH-Deformation); 1360 (C-N-Valenz); 1070 (C-O-Valenz); 1000 (C-H Alkohole), 650 (Kontrollbande N-H-Valenz) (vgl. Anhang 28)

### 9.3.2 $\beta$ -D-Maltobiosylamin

2.5 g  $\alpha$ -D-Maltobiose Monohydrat (6.9 mmol, 1 eq.) wurde in 200 mL gesättigter Ammoniumcarbonat-Lösung gelöst. Anschließend wurde festes Ammoniumcarbonat ( $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ) zugegeben, sodass ein leichter Bodensatz vorhanden war. Die Reaktionsmischung wurde für 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass immer ein Bodensatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  vorhanden war. Wenn sich der Bodensatz mit der Zeit reduziert hat, wurde etwas Ammoniumcarbonat nachdosiert, sodass wieder ein leichter Bodensatz vorhanden war. Nach 5 Tagen wurde das Wasser im Hochvakuum entfernt und der Rückstand trocken gezogen. Zu dem Rückstand wurden 200 mL über Molekularsieb (3 Å) getrocknetes HPLC-Methanol gegeben. Das Gemisch wurde bei 65 °C solange refluxiert bis sich der Rückstand vollständig gelöst hat und die Gasentwicklung (Blasenzähler) zum Erliegen gekommen ist. Die Reaktionslösung wurde anschließend filtriert und das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde am Hochvakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 2.22 g (6.5 mmol, 94 %) weißer, kristalliner Feststoff

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, RT,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] 5.40 (d, 1 H, v); 5.22 (d, 0.04 H,  $m'$  – Edukt ( $\beta$ )) 4.65 (d, 0.08 H,  $m''$  – Edukt ( $\alpha$ )); 4.30 (d, 0.12 H,  $m^*$  - Dimer (Nebenprodukt)); 4.10 (d, 0.82 H, m – Produkt ( $\beta$ )); 3.91-3.14 (m, 12 H, n-r, Gerüstprotonen) (vgl. Anhang 4)



**FTIR** (ATR):  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] 3276 (N-H-Valenz / O-H-Valenz); 2916 (C-H-Valenz); 1650 (N-H-Deformation); 1417 (OH-Deformation); 1365 (C-N-Valenz); 1070 (C-O-Valenz); 1000 (C-H Alkohole), 650 (Kontrollbande N-H-Valenz) (vgl. Anhang 29)

**Elementaranalyse**  $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_{10}$  (theoretisch, %): C 42.23; N 4.10; H 6.79  
(experimentell, %): C 41.63; N 3.61; H 7.06

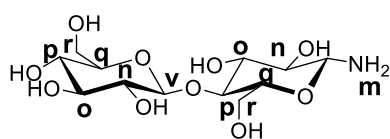
### 9.3.3 $\beta$ -D-Cellobiosylamin

1.5 g D-(+)-Cellobiose (4.38 mmol, 1 eq.) wurde in 75 mL gesättigter Ammoniumcarbonat-Lösung (ca. 26 g, 65 eq.) gelöst. Anschließend wurde festes Ammoniumcarbonat ( $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ) zugegeben, sodass ein leichter Bodensatz vorhanden war. Die Reaktionsmischung wurde für 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass immer ein Bodensatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  vorhanden war. Wenn sich der Bodensatz mit der Zeit reduziert hat, wurde etwas Ammoniumcarbonat nachdosiert, sodass wieder ein leichter Bodensatz vorhanden war. Nach 5 Tagen wurde das Wasser im Hochvakuum entfernt und der Rückstand trocken gezogen. Zu dem Rückstand wurden 75 mL über Molekularsieb (3 Å) getrocknetes HPLC-Methanol gegeben. Das Gemisch wurde bei 65 °C solange refluxiert bis sich der Rückstand vollständig gelöst hat und die Gasentwicklung (Blasenzähler) zum Erliegen gekommen ist. Die Reaktionslösung wurde anschließend filtriert und das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde am Hochvakuum getrocknet.

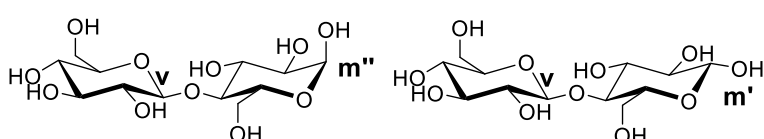
**Ausbeute:** 1.38 g ( 4.04 mmol, 92 %) weißer, kristalliner Feststoff

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, RT,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] 5.24 (d, 0.03 H,  $m'$  – Edukt ( $\beta$ )) 4.67 (d, 0.05 H,  $m''$  – Edukt ( $\alpha$ )); 4.51 (d, 1 H, v); 4.32 (d, 0.18 H,  $m^*$  – Dimer (Nebenprodukt)); 4.12 (d, 0.78 H, m – Produkt ( $\beta$ )); 3.98-3.19 (m, 12 H, n-r, Gerüstprotonen) (vgl. Anhang 6)

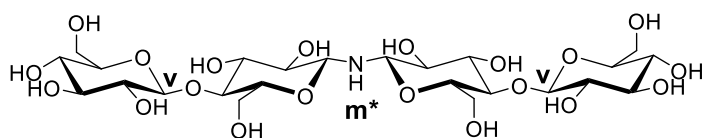
**Cellobiosylamin**



**$\alpha$ -D-Cellobiose /  $\beta$ -D-Cellobiose**



**Di- $\beta$ -D-Cellobiosylamin**



**FTIR** (KBr):  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] 3363 (N-H-Valenz / O-H-Valenz); 2890 (C-H-Valenz); 1620 (N-H-Deformation); 1367 (C-N-Valenz); 1080 (C-O-Valenz); 1030 (C-H Alkohole), 588 (Fingerprint-Bereich) (vgl. Anhang 30)

**Elementaranalyse**  $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_{10}$  (theoretisch, %): C 42.23; N 4.10; H 6.79

(experimentell, %): C 41.24; N 3.26; H 6.87

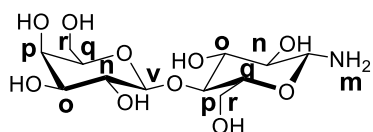
### 9.3.4 $\beta$ -D-Lactosylamin

2.0 g D-Lactose Monohydrat (5.55 mmol, 1 eq.) wurde in 100 mL gesättigter Ammoniumcarbonat-Lösung (ca. 34 g, 356 mmol, 64 eq.) gelöst. Anschließend wurde festes Ammoniumcarbonat ( $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ) zugegeben, sodass ein leichter Bodensatz vorhanden war. Die Reaktionsmischung wurde für 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass immer ein Bodensatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  vorhanden war. Wenn sich der Bodensatz mit der Zeit reduziert hat, wurde etwas Ammoniumcarbonat nachdosiert, sodass wieder ein leichter Bodensatz vorhanden war. Nach 7 Tagen wurde das Wasser im Hochvakuum entfernt und der Rückstand trocken gezogen. Zu dem Rückstand wurden 100 mL über Molekularsieb (3 Å) getrocknetes HPLC-Methanol gegeben. Das Gemisch wurde bei 60 °C solange refluxiert bis sich der Rückstand vollständig gelöst hat und die Gasentwicklung (Blasenzähler) zum Erliegen gekommen ist. Die Reaktionslösung wurde anschließend filtriert und das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde am Hochvakuum getrocknet.

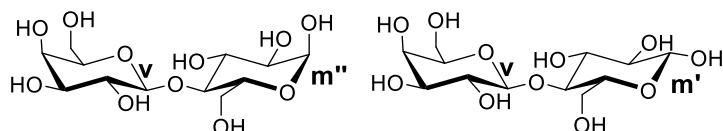
**Ausbeute:** 1.84 g (5.39 mmol, 97 %) weißer, kristalliner Feststoff

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, RT,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] 5.24 (d, 0.01 H,  $m'$  – Edukt ( $\beta$ )) 4.68 (d, 0.08 H,  $m''$  – Edukt ( $\alpha$ )); 4.46 (d, 1 H, v); 4.33 (d, 0.06 H,  $m^*$  - Dimer (Nebenprodukt)); 4.13 (d, 0.96 H, m – Produkt ( $\beta$ )); 3.97-3.20 (m, 12 H, n-r, Gerüstprotonen) (vgl. Anhang 7)

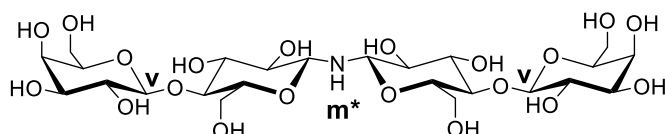
#### Lactosylamin



#### $\alpha$ -D-Lactobiose / $\beta$ -D-Lactobiose



#### Di- $\beta$ -D-Lactosylamin



### 9.3.5 $\beta$ -D-Maltotriosylamin

1.05 g Maltotriose (2.08 mmol, 1 eq.) wurde in 100 mL gesättigter Ammoniumcarbonat-Lösung gelöst. Anschließend wurde festes Ammoniumcarbonat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) zugegeben, so dass ein leichter Bodensatz vorhanden war. Die Reaktionsmischung wurde für 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass immer ein Bodensatz von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> vorhanden war. Wenn sich der Bodensatz mit der Zeit reduziert hat, wurde etwas Ammoniumcarbonat nachdosiert, sodass wieder ein leichter Bodensatz vorhanden war. Nach 5 Tagen wurde das Wasser im Hochvakuum entfernt und der Rückstand trocken gezogen. Zu dem Rückstand wurden 100 mL über Molekularsieb (3 Å) getrocknetes HPLC-Methanol gegeben. Das Gemisch wurde bei 60 °C solange refluxiert bis sich der Rückstand vollständig gelöst hat und die Gasentwicklung (Blasenzähler) zum Erliegen gekommen ist. Die Reaktionslösung wurde anschließend filtriert und das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde am Hochvakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 938 mg (1.86 mmol, 90 %) weißer, kristalliner Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] 5.39 (d, 2 H, v); 5.22 (d, 0.06 H, m' – Edukt (β)) 4.64 (d, 0.10 H, m'' – Edukt (α)); 4.29 (d, 0.09 H, m\* - Dimer (Nebenprodukt)); 4.09 (d, 0.78 H, m – Produkt (β)); 3.97-3.15 (m, 18 H, n-r, Gerüstprotonen) (vgl. Anhang 5)

## 9.4 Synthese des aromatischen Spacers (Glu- C<sub>ar</sub>-NH<sub>2</sub>)

### 9.4.1 *N*-(4-(Aminomethyl)benzoyl)- $\beta$ -D-glucosylamin (Glu-C<sub>ar</sub>-NH<sub>2</sub>)

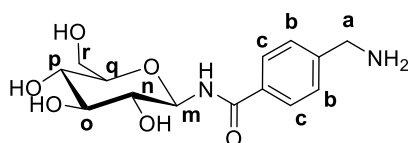
1.5 g 4-(F<sub>moc</sub>-aminomethyl)benzoesäure (4 mmol, 1 eq.) wurde in 10 mL DMF gelöst. Zu der Lösung wurden 3.5 mL DIPEA (20 mmol, 5 eq.) gegeben und gerührt. Anschließend wurden 1.53 g (4 mmol, 1 eq.) HBTU fest dazu gegeben und mit 5 mL DMF nachgespült, woraufhin sich die Lösung orange verfärbt. Es wurde für 5 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor 792 mg Glucosylamin (4.4 mmol, 1.1 eq.) zur Reaktion gegeben und mit 20 mL DMF nachgespült wurden. Anschließend wurde die Reaktion für 48 h bei Raumtemperatur gerührt und in 600 mL destilliertem Wasser ausgefällt. Das feine Präzipitat wurde zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Zum Waschen des Präzipitats und zum Entfernen des restlichen DMFs wurde das Präzipitat mindestens 5x mit kaltem destilliertem Wasser aufgeschlämmt und erneut abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Präzipitat erneut mit destilliertem Wasser aufgeschlämmt und an der Gefriertrocknung getrocknet.

**Ausbeute:** 1.75 g (3.27 mmol, 81 %) weißer bis helloranger Feststoff

In einem zweiten Reaktionsschritt wurde die F<sub>moc</sub>-Schutzgruppe abgespalten, um das freie Amin zu erzeugen. Hierfür wurden 1.5 g der Vorstufe (2.8 mmol, 1 eq.) in 25 mL DMF gelöst und mit 4 mL Piperidin (40.4 mmol, 14.4 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt in 400 mL kaltem Diethylether ausgefällt und bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Produkt (feiner, weißer Niederschlag) mindestens 3-mal mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde über Nacht im Vakuum getrocknet, woraufhin sich das Produkt leicht orange verfärbt hat.

**Ausbeute:** 802 mg (2.57 mmol, 92 %) weiß-helloranger Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] 7.81-7.75 (m, 2 H, c); 7.48-7.39 (m, 2 H, b); 5.17 (d, 0.79 H, m); 3.93 (s, 2 H, a); 3.89-3.10 (m, 6 H, n-r, Gerüstprotonen) (vgl. Anhang 11)



## 9.5 Synthese der Polypeptide

### 9.5.1 Poly-( $\gamma$ -Benzyl-L-glutamat) (PBLG)

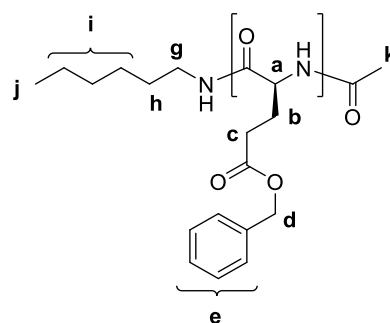
Die Synthese des PBLG wurde nach einer Vorschrift von HABRAKEN et al. über amin-initiierte ringöffnende Polymerisation des BLG-NCA-Monomers mit Hexylamin bei 0 °C durchgeführt.<sup>[51]</sup> Die im Folgenden beschriebene Durchführung und Charakterisierung ist exemplarisch für alle hergestellten PBLGs am Beispiel von PBLG 6 (s. Tabelle 9-9) gezeigt.

Das BLG-NCA Monomer (3.2 g, 12.15 mmol, 1 eq.) wurde hierfür in ein zuvor ausgeheiztes Schlenkrohr eingewogen und durch viermaliges Evakuieren und Belüften mit über Calciumchlorid getrockneten Stickstoff unter Inertgas-Atmosphäre gesetzt. Anschließend wurde das BLG-NCA Monomer in trockenem DMF (SPS-Anlage) gelöst (23 mL, Endkonzentration nach Initiatorzugabe: 11.1 % w/v) und auf 0 °C abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde das *n*-Hexylamin in einem ausgeheizten und mit Stickstoff gespülten Schraubdeckelgläschen mit Septum in 2 mL DMF gelöst und in eine Einwegspritze überführt. Das Schraubdeckelgläschen wurde mit 2 mL DMF nachgespült. Die *n*-Hexylamin-Lösung und die Spüllösung wurden zeitgleich zur BLG-NCA-Lösung gegeben, um die Polymerisation zu starten. Die Reaktionsmischung wurde für 7 Tage bei 0 °C unter Stickstoff gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde Essigsäureanhydrid (1.62 mL, 1.5 eq zum NCA) zur Reaktionsmischung hinzugegeben und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dieser Schritt wurde durchgeführt, damit als Endgruppe kein freies Amin vorliegt. Im Anschluss wurde das PBLG in Diethylether ausgefällt, über eine Fritte abgesaugt, gewaschen und im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 2.55 g (11.62 mmol, 96 %) - feiner, weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, CDCl<sub>3</sub>:TFA (3:1)):  $\delta$  [ppm] 7.29 (m, n\*5H, e); 5.08 (q, n\*2H, d); 4.60 (q, n\*1H, a); 3.23 (m, 2H, g); 2.45 (t, n\*2H, c); 2.10/1.92 (m, n\*2H +3H, b,k); 1.48 (m, 2H, h); 1.27 (m, 6H, i); 0.87 (t, 3H, j); (vgl. Anhang 1)

**FTIR** (ATR):  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] 3292 (N-H-Valenz Amid); 1730 (C-O-Valenz Ester); 1651 (Amid I); 1541 (Amid II); 1163 (C-O-C Ester); 743/693 (monosubstituierter Aromat); (vgl. Anhang 20)



Eine Übersicht über die hergestellten PBLGs und ihrer Molekulargewichte und Polymerisationsgrade findet sich in Tabelle 9-9.

**Tabelle 9-9 Molekulargewichte und Polymerisationsgrade der hergestellten PBLGs  
(NCA:\*Isochem, # IRIS Biotech)**

<b>PBLG</b>	<b>M/I</b>	<b>Umsatz</b>	<b>P<sub>n</sub> (theor.)</b>	<b>M<sub>n</sub> [g/mol]</b>	<b>M<sub>w</sub> [g/mol]</b>	<b>Đ</b>	<b>P<sub>n</sub> (GPC)</b>
<b>PBLG 1*</b>	60	95 %	57	13,700 ± 200	13,900 ± 200	1.01	62
<b>PBLG 2*</b>	60	95 %	57	13,200 ± 800	13,700 ± 800	1.04	60
<b>PBLG 3*</b>	60	89 %	53	12,300 ± 200	12,400 ± 200	1.01	56
<b>PBLG 4*</b>	60	88 %	53	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<b>PBLG 5*</b>	62.5	89 %	56	10,400 ± 300	10,600 ± 100	1.02	48
<b>PBLG 6<sup>#</sup></b>	64	96 %	61	11,200 ± 200	11,500 ± 100	1.02	51
<b>PBLG 7<sup>#</sup></b>	138	92 %	127	15,400 ± 400	16,600 ± 300	1.07	70
<b>PBLG 8<sup>#</sup></b>	140	95 %	133	16,200 ± 300	17,800 ± 200	1.10	74



### 9.5.2 Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure Natriumsalz (PGA-Na)

Die Synthese der Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure (PGA) erfolgte ausgehend von PBLG nach einer Literaturvorschrift von BABIN et. al.<sup>[114]</sup> Die im Folgenden beschriebene Durchführung ist exemplarisch für alle hergestellten PGA-Na's am Beispiel von PGA 1 gezeigt (s. Tabelle 9-10).

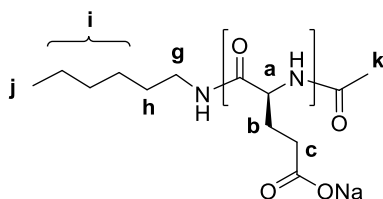
740 mg PBLG (3.4 mmol, 1 eq.) wurden in einem 50 mL Schlenkrohr in 8 mL Trifluoressigsäure gelöst ( $\approx 0.1$  g/mL). Anschließend wurden vorsichtig 2.8 mL HBr-Lösung (33 %-ig in Essigsäure) mit einer Pipette langsam zugetropft (starke Gasentwicklung). Die Gasentwicklung wurde über einen Blasenähler verfolgt. Nach Erliegen der Gasbildung wurde das Schlenkrohr verschlossen und die Reaktionsmischung für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die PGA in ca. 250 mL Diethylether unter starkem Rühren ausgefällt und für weitere 15 Minuten gerührt. Die PGA wurde auf eine POR4-Fritte gegeben und mit Diethylether gewaschen, trocken gezogen und für 1 Stunde im Vakuum getrocknet. Daraufhin wurde das Polymer in der Fritte mit viel destilliertem Wasser gewaschen, um Reste vom HBr zu entfernen. Die PGA wurde für 2 Tage im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 419.9 mg (3.25 mmol, 96 %) – weißer Feststoff

Im Anschluss wurde die PGA (419.9 mg, 3.25 mmol, 1 eq.) deprotoniert, indem sie für 30 min in einer 0.5 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gerührt wurde (18 mL  $\equiv$  9 mmol, 2.75 eq.). Nach der Deprotonierung wurde die PGA zunächst gegen 0.1 M NaCl-Lösung und letztendlich gegen destilliertes Wasser dialysiert (MWCO = 3,500 g/mol) (quillt beim Wechsel auf destilliertes Wasser sehr stark auf im Dialyseschlauch!). Nach Lyophilisation wurde das Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure Natriumsalz (PGA-Na) erhalten.

**Ausbeute:** 491.3 mg (3.25 mmol, 100 %) - weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] 4.33 (q, n\*1H, a); 3.20 (m, 2H, g); 2.29 (m, n\*2H, c); 2.04/1.94 (m, n\*2H + 3H, b,k); 1.50 (qi, 2H, h); 1.27 (m, 6H, i); 0.86 (t, 3H, j); (vgl. Anhang 2)



**FTIR** (ATR):  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] 3263 (N-H-Valenz Amid); 2975 (C-H-Valenz); 1645 (Amid I); 1541 (Amid II); 1396 (Carboxylat-Valenz); (vgl. Anhang 21)

Eine Übersicht über die hergestellten PGA-Na's und ihrer Molekulargewichte und Polymerisationsgrade findet sich in Tabelle 9-10.

**Tabelle 9-10 Molekulargewichte und Polymerisationsgrade der hergestellten PGA-Na's**

<b>PGA-Na</b>	<b>Ausbeute</b>	<b>M<sub>n</sub> [g/mol]</b>	<b>M<sub>w</sub> [g/mol]</b>	<b>Đ</b>	<b>P<sub>n</sub> (GPC)</b>
<b>PGA 1</b>	68 %	7,900 ± 400	8,200 ± 350	1.03	62
<b>PGA 2</b>	72 %	7,800 ± 300	8,200 ± 300	1.06	61
<b>PGA 3</b>	100 %	n.b	n.b.	n.b	n.b
<b>PGA 4</b>	91 %	6,800 ± 400	7,800 ± 300	1.14	53
<b>PGA 5</b>	90 %	8,700 ± 300	8,900 ± 300	1.01	68
<b>PGA 6</b>	98 %	6,800 ± 50	6,800 ± 50	1.00	53
<b>PGA 7</b>	82 %	12,800 ± 100	14,000 ± 100	1.09	100
<b>PGA 8</b>	96 %	9,600 ± 500	10,000 ± 500	1.04	74

## 9.6 Polymeranaloge Funktionalisierung von PGA-Na mittels Amidkupplung

### 9.6.1 Allgemeine Synthesevorschriften

Für die polymeranaloge Funktionalisierung der hergestellten Polypeptide mit Aminosuktern wurde eine Vorgehensweise von R. MILDNER et. al. adaptiert.<sup>[92]</sup>

Hierfür wurden die PGA-Na's und die verwendeten Aminosucker in Milliporewasser gelöst und für 15 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von DMT-MM in Milliporewasser zugegeben und die Reaktionsmischung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Konzentration der Lösung betrug hierbei 3.3 mg/mL bezogen auf die PGA-Na. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Ansätze gegen 0.1 M NaCl-Lösung und destilliertes Wasser dialysiert (MWCO 3,500 g/mol) und schließlich lyophilisiert.

Es wurden jeweils fünf verschiedene Ansätze hergestellt, bei denen die DMT-MM zu PGA-Na Verhältnisse variiert wurden, um unterschiedliche Glycosylierungsgrade zu erzielen. Die Aminosucker wurde jeweils im doppelten Überschuss zum DMT-MM eingesetzt, damit immer ausreichend Zucker für die Funktionalisierung zur Verfügung stehen. Eine Übersicht über die verwendeten Verhältnisse findet sich in Tabelle 9-11.

**Tabelle 9-11 Eingesetzte Stoffmengenverhältnisse für die Glycosylierungsreaktion**

	Stoffmengenverhältnis [eq.]		
	PGA-Na	DMT-MM	Aminosucker
<b>A</b>	1	0.1	0.2
<b>B</b>	1	0.25	0.5
<b>C</b>	1	0.5	1
<b>D</b>	1	1	2
<b>E</b>	1	2	2

Für die polymeranaloge Funktionalisierung der hergestellten Polypeptide mit dem aromatischen Spacer (C<sub>ar</sub>-Glucose) wurde prinzipiell genauso vorgegangen, nur dass der Spacer und die PGA-Na nicht in Milliporewasser sondern in einer Mischung aus 0.05 M HCl Lösung und Milliporewasser gelöst wurden. Die HCl-Menge wurde dabei so gewählt, dass sie äquimolar zur Menge der C<sub>ar</sub>-Glucose war. Diese liegt dann protoniert als Hydrochlorid vor, was in Testversuchen zu einer besseren Kupplungseffizienz geführt hat.

### 9.6.2 Funktionalisierung mit $\beta$ -D-Glucosylamin

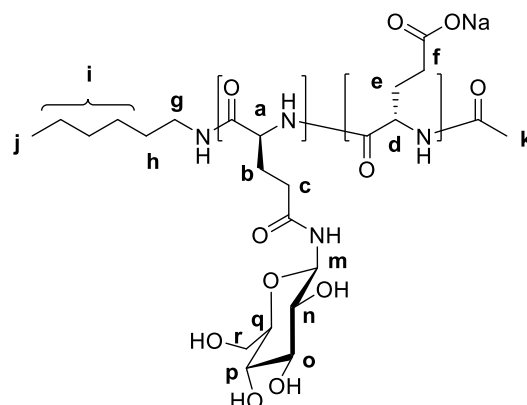
Die Funktionalisierung der PGA-Na erfolgte nach der allgemeinen Synthesevorschrift (vgl. Kapitel 9.6.1). Als Aminosucker wurde kommerzielles  $\beta$ -D-Glucopyranosylamin von CARBO-SYNTH verwendet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 9-12.

Tabelle 9-12 Ergebnisse der wässrigen Amidkupplung von  $\beta$ -D-Glucopyranosylamin an PGA-Na

Stoffmengenverhältnis [eq.]						
PGA-Glucose	Basispolymer	PGA	DMT-MM	Glu-NH <sub>2</sub>	DS	M <sub>MRW</sub> [g/mol]
A	PGA 1	1	0.1	0.2	0.06	159.85
B	PGA 1	1	0.25	0.5	0.19	176.83
C	PGA 1	1	0.5	1	0.36	201.47
D	PGA 1	1	1	2	0.62	236.68
E	PGA 1	1	2	2	0.79	261.32
D'	PGA 7	1	1	2	0.61	235.99
E'	PGA 7	1	2	2	0.81	263.82

**Ausbeute:** 80-93 % fluffig, weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] 4.96 (m); 4.31 (a/d); 3.88-3.37 (n-r); 3.19 (g); 2.44-2.30 (c/f); 2.12-2.04 (b/e/k) 1.49 (h); 1.26 (i); 0.84 (j); (vgl. Abb. 4-6) – exemplarisch für D



Der Substitutionsgrad wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum über die Integralverhältnisse der Peptidrückgrat-Protonen a und d im Verhältnis zu den Gerüstprotonen des Glucoserests (n-r) bestimmt.

**FTIR** (ATR):  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] 3273 (N-H-Valenz Amid/ OH-Valenz); 2931 (CH-Valenz); 1645 (Amid I); 1541 (Amid II); 1398 (Carboxylatvalenz); 1074/1034 (C-OH Valenz); 646 (s. Abb. 4-5)

### 9.6.3 Funktionalisierung mit $\beta$ -D-Maltobiosylamin

Die Funktionalisierung der PGA-Na erfolgte nach der allgemeinen Synthesevorschrift (vgl. Kapitel 9.6.1). Als Aminozucker wurde über KOCHETKOV-Aminierung hergestelltes  $\beta$ -D-Maltobiosylamin verwendet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 9-13.

Tabelle 9-13 Ergebnisse der wässrigen Amidkupplung von  $\beta$ -D-Maltobiosylamin an PGA-Na

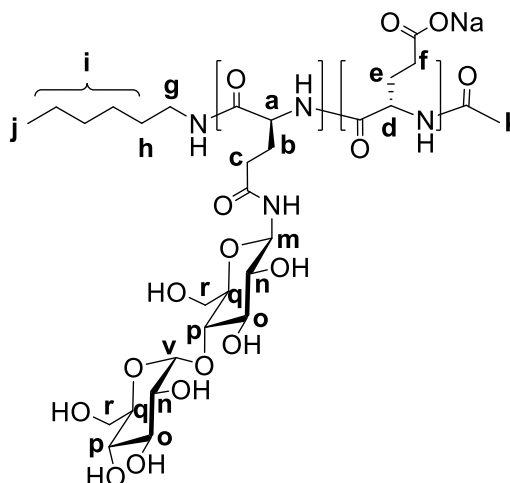
PGA-Maltobiose	Basispolymer	Stoffmengenverhältnis [eq.]				$M_{MRW}$ [g/mol]
		PGA	DMT-MM	Glu-NH <sub>2</sub>	DS	
<b>A</b>	PGA 3	1	0.1	0.2	0.08	173.98
<b>B</b>	PGA 3	1	0.25	0.5	0.20	212.55
<b>C</b>	PGA 3	1	0.5	1	0.40	272.52
<b>D</b>	PGA 3	1	1	2	0.64	346.65
<b>E</b>	PGA 3	1	2	2	0.80	392.14
<b>D'</b>	PGA 7	1	1	2	0.63	340.92
<b>E'</b>	PGA 7	1	2	2	0.81	395.16

**Ausbeute:** 83-93 % fluffig, weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] 5.44 (v); 5.00 (m); 4.34 (a/d); 3.93-3.57 (n,o,q,r); 3.47-3.41 (p) 3.21 (g); 2.46-2.35 (c/f); 2.15-2.07 (b/e/k); 1.51 (h); 1.29 (i); 0.87 (j); (vgl. Anhang 9) – exemplarisch für D

Der Substitutionsgrad wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum über die Integralverhältnisse der Peptidrückgrat-Protonen a und d im Verhältnis zu den Gerüstprotonen des Maltobioserests (n-r) bestimmt.

**FTIR** (ATR):  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] 3275 (N-H-Valenz Amid/ OH-Valenz); 2925 (CH-Valenz); 1645 (Amid I); 1545 (Amid II); 1402 (Carboxylatvalenz); 1026 (C-OH Valenz); 648 (s. Anhang 24)



### 9.6.4 Funktionalisierung mit $\beta$ -D-Cellobiosylamin

Die Funktionalisierung der PGA-Na erfolgte nach der allgemeinen Synthesevorschrift (vgl. Kapitel 9.6.1). Als Aminozucker wurde über KOCHETKOV-Aminierung hergestelltes  $\beta$ -D-Cellobiosylamin verwendet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 9-14.

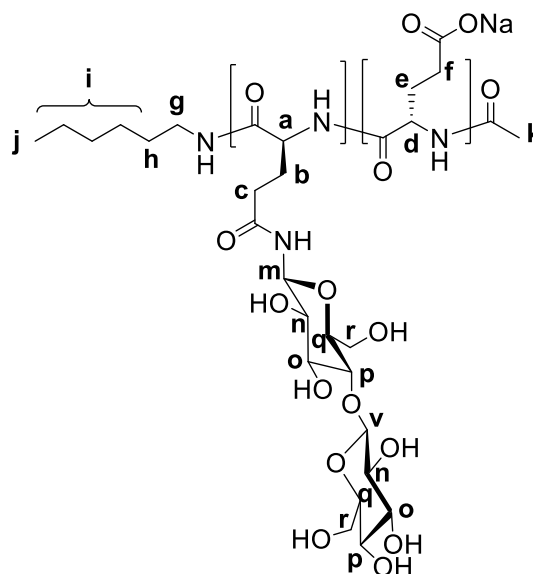
Tabelle 9-14 Ergebnisse der wässrigen Amidkupplung von  $\beta$ -D-Cellobiosylamin an PGA-Na

Stoffmengenverhältnis [eq.]						
PGA-Cellobiose	Basispolymer	PGA	DMT-MM	Glu-NH <sub>2</sub>	DS	M <sub>MRW</sub> [g/mol]
A	PGA 2	1	0.1	0.2	0.07	171.57
B	PGA 2	1	0.25	0.5	0.18	205.02
C	PGA 2	1	0.5	1	0.36	260.46
D	PGA 2	1	1	2	0.55	317.41
E	PGA 2	1	2	2	0.74	374.67

**Ausbeute:** 84-88 % fluffig, weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] 5.01 (m); 4.54 (v); 4.34 (a/d); 3.96-3.32 (n,o,p,q,r); 3.21 (g); 2.46-2.33 (c/f); 2.15-2.06 (b/e/k); 1.51 (h); 1.28 (i); 0.87 (j); (vgl. Anhang 8) – exemplarisch für D

Der Substitutionsgrad wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum über die Integralverhältnisse der Peptidrückgrat-Protonen a und d im Verhältnis zu den Gerüstprotonen des Cellobioserests (n-r) bestimmt.



**FTIR** (ATR):  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] 3269 (N-H-Valenz Amid/ OH-Valenz); 2925 (CH-Valenz); 1645 (Amid I); 1541 (Amid II); 1400 (Carboxylatvalenz); 1026 (C-OH Valenz); 646 (s. Anhang 25)

### 9.6.5 Funktionalisierung mit $\beta$ -D-Lactosylamin

Die Funktionalisierung der PGA-Na erfolgte nach der allgemeinen Synthesevorschrift (vgl. Kapitel 9.6.1). Als Aminosucker wurde über KOCHETKOV-Aminierung hergestelltes  $\beta$ -D-Lactosylamin verwendet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 9-15.

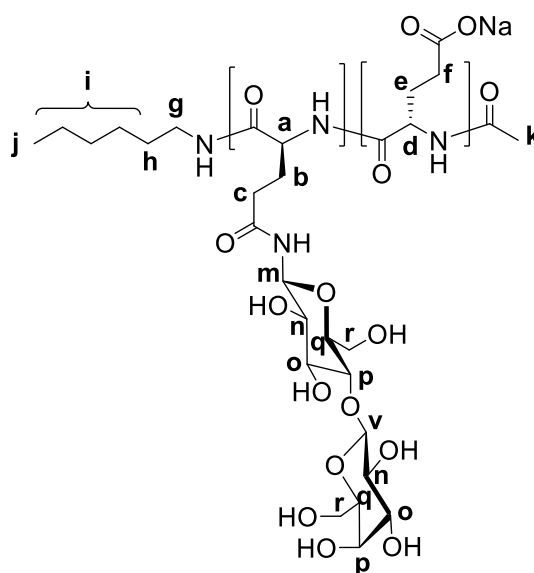
Tabelle 9-15 Ergebnisse der wässrigen Amidkupplung von  $\beta$ -D-Lactosylamin an PGA-Na

Stoffmengenverhältnis [eq.]						
PGA-Lactose	Basispolymer	PGA	DMT-MM	Glu-NH <sub>2</sub>	DS	M <sub>MRW</sub> [g/mol]
A	PGA 4	1	0.1	0.2	0.07	171.57
B	PGA 4	1	0.25	0.5	0.19	207.13
C	PGA 4	1	0.5	1	0.36	260.16
D	PGA 4	1	1	2	0.54	314.55
E	PGA 4	1	2	2	0.80	391.84

**Ausbeute:** 82-89 % fluffig, weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] 4.99 (m); 4.45 (v); 4.30 (a/d); 3.93-3.44 (n,o,p,q,r); 3.19 (g); 2.43-2.31 (c/f); 2.11-2.03 (b/e/k); 1.48 (h); 1.26 (i); 0.84 (j); (vgl. Anhang 10) – exemplarisch für D

Der Substitutionsgrad wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum über die Integralverhältnisse der Peptidrückgrat-Protonen a und d im Verhältnis zu den Gerüstprotonen des Lactoserests (n-r) bestimmt.



**FTIR** (ATR):  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] 3270 (N-H-Valenz Amid/ OH-Valenz); 2927 (CH-Valenz); 1645 (Amid I); 1543 (Amid II); 1402 (Carboxylatvalenz); 1036 (C-OH Valenz); 648 (s. Anhang 26)

### 9.6.6 Funktionalisierung mit $\beta$ -D-Maltotriosylamin

Die Funktionalisierung der PGA-Na erfolgte nach der allgemeinen Synthesevorschrift (vgl. Kapitel 9.6.1). Als Aminozucker wurde über KOCHETKOV-Aminierung hergestelltes  $\beta$ -D-Maltotriosylamin verwendet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 9-16.

Tabelle 9-16 Ergebnisse der wässrigen Amidkupplung von  $\beta$ -D-Maltotriosylamin an PGA-Na

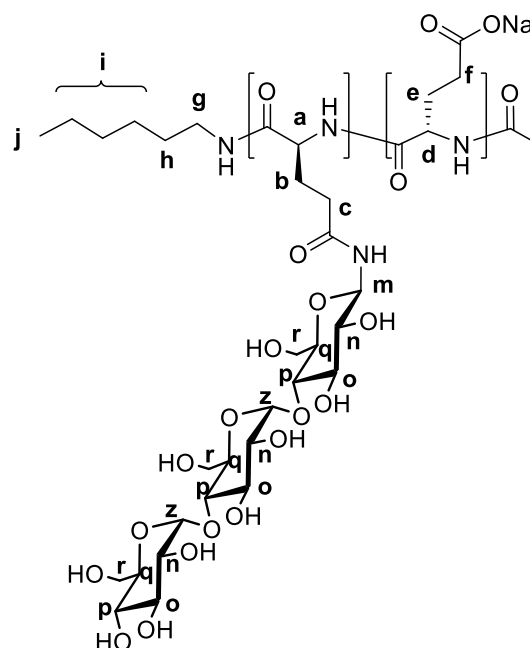
Stoffmengenverhältnis [eq.]						
PGA-Maltotriose	Basispolymer	PGA	DMT-MM	Glu-NH <sub>2</sub>	DS	M <sub>MRW</sub> [g/mol]
A	PGA 4	1	0.1	0.2	0.07	183.06
B	PGA 4	1	0.25	0.5	0.20	245.63
C	PGA 4	1	0.5	1	0.39	333.69
D	PGA 4	1	1	2	0.63	443.07
E	PGA 4	1	2	2	0.80	523.24
D'	PGA 7	1	1	2	0.60	429.16
E'	PGA 7	1	2	2	0.83	535.76

**Ausbeute:** 81-85 % fluffig, weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] 5.42 (z); 5.01 (m); 4.35 (a/d); 4.01-3.41 (n,o,p,q,r); 3.21 (g); 2.47-2.33 (c/f); 2.16-2.07 (b/e/k); 1.52 (h); 1.29 (i); 0.88 (j); (vgl. Abb. 4-7) – exemplarisch für D

Der Substitutionsgrad wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum über die Integralverhältnisse der Peptidrückgrat-Protonen a und d im Verhältnis zu den Gerüstprotonen des Maltotrioserests (n-r) bestimmt.

**FTIR** (ATR):  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] 3267 (N-H-Valenz Amid/ OH-Valenz); 2927 (CH-Valenz); 1645 (Amid I); 1545 (Amid II); 1402 (Carboxylatv.); 1022 (C-OH Valenz); 650 (s. Anhang 27)





### 9.6.7 Funktionalisierung mit dem aromatischen Spacer (C<sub>ar</sub>-Glucose)

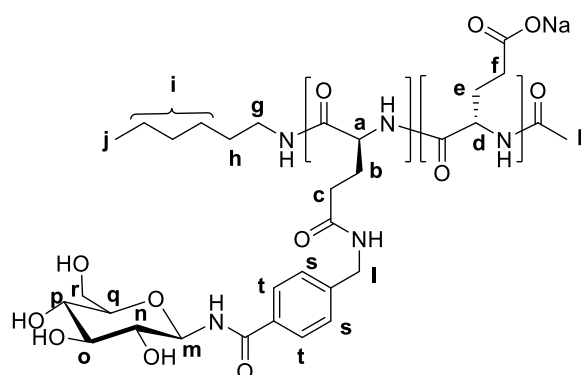
Die Funktionalisierung der PGA-Na mit dem aromatischen Spacer (C<sub>ar</sub>-Glucose) erfolgte nach der allgemeinen Synthesevorschrift (vgl. Kapitel 9.6.1), jedoch unter Zugabe äquimolaren Mengen 0.05 M HCl-Lösung. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 9-17.

Tabelle 9-17 Ergebnisse der wässrigen Amidkupplung von C<sub>ar</sub>-Glucose an PGA-Na

PGA-C <sub>ar</sub> -Glucose	Basispolymer	Stoffmengenverhältnis [eq.]				M <sub>MRW</sub> [g/mol]
		PGA	DMT-MM	Glu-NH <sub>2</sub>	DS	
<b>A</b>	PGA 6	1	0.1	0.2	0.09	175.59
<b>B1</b>	PGA 6	1	0.25	0.5	0.23	213.72
<b>B2</b>	PGA 6	1	0.25	0.5	0.22	210.99
<b>C</b>	PGA 6	1	0.5	1	0.41	262.74
<b>D</b>	PGA 6	1	1	2	0.76	358.06
<b>E</b>	PGA 6	1	2	2	1.00	423.42
<b>C'</b>	PGA 7	1	0.5	1	0.49	284.53
<b>D'</b>	PGA 7	1	1	2	0.86	385.29
<b>E'</b>	PGA 7	1	2	2	1.00	423.42

**Ausbeute:** 68-98 % fluffig, weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] 7.74 (t); 7.33 (s); 5.16 (m); 4.37 (l); 4.25 (a/d) 3.87-3.47 (n,o,p,q,r); 3.17 (g); 2.35 (c/f); 2.03 (b/e/k); 1.47 (h); 1.26 (i); 0.83 (j); (vgl. Anhang 12) – exemplarisch für B



Der Substitutionsgrad wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum über die Integralverhältnisse der Peptidrückgrat-Protonen (a/d) im Verhältnis zu den aromatischen Protonen des Spacers (t/s) bestimmt.

**FTIR** (ATR): ν [cm<sup>-1</sup>] 3280 (N-H-Valenz Amid/ OH-Valenz); 2933 (CH-Valenz); 1643 (Amid I); 1539 (Amid II); 1402 (Carboxylatv.); 1290 (OH-Def.); 1076 (C-OH Valenz); 651 (s. Anhang 23)

## 9.7 Synthese der Blockcopolymeren

Die Synthese der Blockcopolymeren erfolgte analog zur Synthese der Polypeptide über amin-initiierte ringöffnende Polymerisation der NCA-Monomere bei 0 °C. Um Blockcopolymeren zu erzeugen, wurde amin-endfunktionalisiertes pNIPAM als Makroinitiator in der Polymerisation eingesetzt. Für PBLG-*b*-pNIPAM Blockcopolymeren wurde kommerziell erhältliches BLG-NCA als Monomer verwendet. Für die auf Lysin basierenden Blockcopolymeren wurde zunächst das entsprechende NCA ausgehend von *N*<sub>6</sub>-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (H-Lys(Z)-OH) nach einer Literaturvorschrift hergestellt.<sup>[149]</sup>

### 9.7.1 *N*<sub>6</sub>-Benzyloxycarbonyl-L-Lysin *N*-Carboxyanhydrid

2.02 g H-Lys(Z)-OH (7.1 mmol) wurden mit 3.3 mL  $\alpha$ -Pinen (20.9 mmol) in 30 mL Ethylacetat suspendiert und unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre zum Refluxieren erhitzt (77 °C). Anschließend wurden 940 mg Triphosgen (3.2 mmol) in 5 mL Ethylacetat gelöst und langsam zu der refluxierenden Reaktionsmischung getropft. Die Reaktion wurde daraufhin für weitere 3 h bei 77 °C gerührt. Während dieser Zeit wurde die Suspension zunehmend klarer, sodass nach 3 h nur noch eine leichte Trübung der Lösung beobachtet werden konnte. Die Reaktionsmischung wurde daraufhin über eine POR4 Glassinterfritte filtriert und die Lösung auf etwa 1/3 aufkonzentriert (ca. 12 mL). Es wurden 16 mL *n*-Heptan zugegeben und die Lösung auf 60 °C erhitzt bis sich der Niederschlag komplett gelöst hat. Die Lösung wurde danach auf Raumtemperatur abkühlen lassen und für mehrere Stunden in den Kühlschrank gestellt. Hierbei bildet sich ein Präzipitat, das über eine POR4 Fritte abgesaugt und mit *n*-Heptan nachgewaschen wurde. Der so erhaltene Feststoff wurde erneut aus Ethylacetat und *n*-Heptan umkristallisiert, gewaschen und getrocknet. Die beim Aufkonzentrieren und Umkristallisieren angefallenen Lösungsmittelabfälle wurden vor dem Entsorgen mit Ammoniak-Lösung versetzt, um überschüssiges Phosgen in der Lösung zu beseitigen.

**Ausbeute:** 70-83 % weißer Feststoff

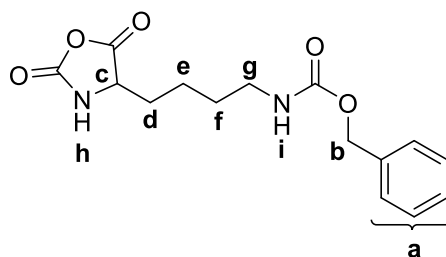
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] 7.28 ppm (m, 5H,

a); 6.87 (s, 1H, i); 5.03 (s, 2H, b); 4.87 (s, 1H, h); 4.19 (t,

1H, c); 3.13 (m, 2H, g); 1.88/1.75 (m, 2H, d); 1.50-1.28 (m, 4H, e/f) – vgl. Anhang 16

**Elementaranalyse** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (theoretisch, %): C 58.82; N 9.15; H 5.92

(experimentell, %): C 58.97; N 9.09; H 5.92



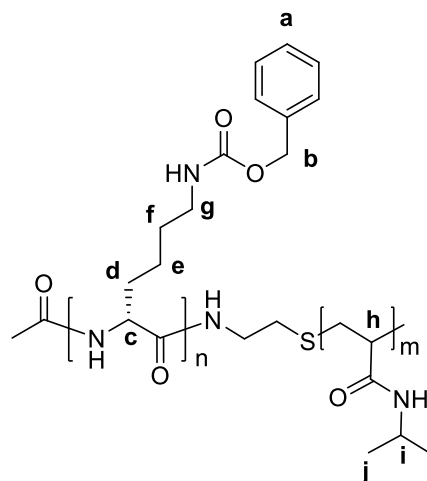
### 9.7.2 PZLL-*b*-pNIPAM

Die Synthese des PZLL-*b*-pNIPAM wurde über amin-initiierte ringöffnende Polymerisation des Lysin-NCA-Monomers mit amin-endfunktionalisiertem pNIPAM ( $M = 2,500 \text{ g/mol}$ ) bei  $0^\circ\text{C}$  durchgeführt. Es wurden 3 verschiedene Blocklängenverhältnisse hergestellt (PZLL : pNIPAM A = 1:1, B = 2:1 und C = 3:1). Die im Folgenden beschriebene Durchführung und Charakterisierung ist exemplarisch für alle hergestellten PZLL-*b*-pNIPAM Copolymere.

Das Lysin-NCA Monomer (A = 270 mg, B = 540 mg, C = 809 mg; 1 eq.) wurde hierfür in ein zuvor ausgeheiztes Schlenkrohr eingewogen und durch viermaliges Evakuieren und Belüften mit über Calciumchlorid getrockneten Stickstoff unter Inertgas-Atmosphäre gesetzt. Anschließend wurde das Lysin-NCA Monomer in trockenem DMF (SPS-Anlage) gelöst (A = 1.5 mL, B = 2.5 mL, C = 3.5 mL) und auf  $0^\circ\text{C}$  abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde das amin-endfunktionalisierte pNIPAM (A, B, C = 100 mg) in einem ausgeheizten und mit Stickstoff gespülten Schraubdeckelgläschen mit Septum in 1 mL DMF gelöst und in eine Einwegspritze überführt. Das Gläschen wurde mit DMF nachgespült (A = 1 mL, B = 2.5 mL, C = 3.5 mL). Beide Lösungen wurde zeitgleich zur Lysin-NCA-Lösung gegeben (Die Lösemittelmengen wurden so gewählt, dass die Konzentration in allen 3 Ansätzen 11.1 wt-% entsprach). Die Reaktionsmischung wurde dann für 11 Tage bei  $0^\circ\text{C}$  unter Stickstoff gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurden die Schlenkrohre geöffnet und die Polymere ausgefällt (A = kalter Diethylether, B und C = Wasser). Im Anschluss wurden die Blockcopolymere abzentrifugiert und gewaschen (A = kalter Diethylether, B und C = Wasser) und im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** A: 271 mg, B: 343 mg, C: 651 mg (64-82 %) – weißer Feststoff

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, RT,  $\text{CDCl}_3:\text{TFA}$  (3:1)):  $\delta$  [ppm] 7.16 (m, a); 4.95 (s, b); 4.28 (t, c); 3.80 (b, i); 2.95 (m, g); 1.65-1.41 (m, d); 1.38-1.05 (m, e+f); 1.05-0.85 (m, j) – vgl. Anhang 17



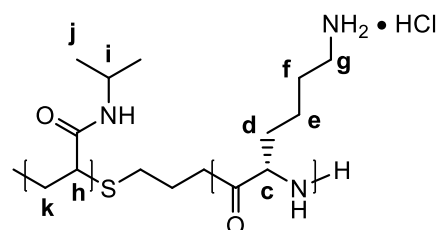
### 9.7.3 PLL-*b*-pNIPAM

Die Synthese des PLL-*b*-pNIPAM erfolgte ausgehend von PZLL-*b*-pNIPAM analog zur Entschützung von PBLG mittels saurer Hydrolyse für die drei verschiedenen Blocklängenverhältnisse (PZLL : pNIPAM A = 1:1, B = 2:1, C = 3:1).

In einem Schlenkrohr wurde PZLL-*b*-pNIPAM (A: 205 mg, B: 300 mg, C: 548 mg) vorgelegt und in Trifluoressigsäure (A = 4 mL, B = 6 mL, C = 10 mL) gelöst. Anschließend wurde vorsichtig HBr-Lösung (33 %-ig in Essigsäure, A = 438  $\mu$ L, B = 774  $\mu$ L, C = 1.51 mL) mit einer Pipette langsam zugetropft (starke Gasentwicklung). Die Gasentwicklung wurde über einen Blasen-zähler verfolgt. Nach Erliegen der Gasbildung wurde das Schlenkrohr verschlossen und die Reaktionsmischung für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das PLL-*b*-pNIPAM in ca. 200 mL Diethylether unter starkem Rühren ausgefällt und für weitere 15 Minuten gerührt. Das PLL-*b*-pNIPAM wurde abzentrifugiert und mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde für 1.5 Stunden im Vakuum getrocknet, um überschüssigen Diethylether zu entfernen. Anschließend wurde das PLL-*b*-pNIPAM in Wasser gelöst und gegen 0.1 M NaCl-Lösung und destilliertes Wasser dialysiert. Nach Lyophilisation wurde das PLL-*b*-pNIPAM erhalten.

**Ausbeute:** A: 116 mg, B: 140 mg, C: 284 mg (64-76 %) – weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] 4.23 (m, c); 3.88 (s, i); 2.94 (m, g); 2.11-1.41 (m, d-f und h-k); 1.12 (s, j) – vgl. Anhang 18



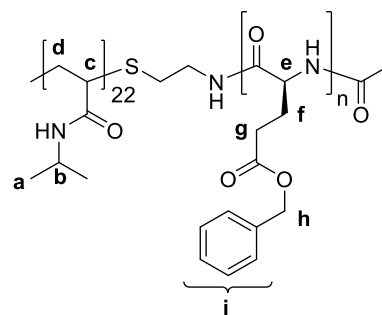
### 9.7.4 PBLG-*b*-pNIPAM

Die Synthese des PBLG-*b*-pNIPAM wurde über amin-initiierte ringöffnende Polymerisation des BLG-NCA-Monomers mit amin-endfunktionalisiertem pNIPAM ( $M = 2,500 \text{ g/mol}$ ) bei  $0^\circ\text{C}$  durchgeführt. Es wurden analog zum PZLL-*b*-pNIPAM drei verschiedene Blocklängenverhältnisse hergestellt (PBLG : pNIPAM A = 1:1, B = 2:1 und C = 3:1). Die im Folgenden beschriebene Durchführung und Charakterisierung ist exemplarisch für alle hergestellten PBLG-*b*-pNIPAM Copolymere.

Das BLG-NCA Monomer (A = 232 mg, B = 464 mg, C = 695 mg; 1 eq.) wurde hierfür in ein zuvor ausgeheiztes Schlenkrohr eingewogen und durch viermaliges Evakuieren und Belüften mit über Calciumchlorid getrockneten Stickstoff unter Inertgas-Atmosphäre gesetzt. Anschließend wurde das BLG-NCA Monomer in trockenem DMF (SPS-Anlage) gelöst (A = 1.4 mL, B = 2.2 mL, C = 3.2 mL) und auf  $0^\circ\text{C}$  abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde das amin-endfunktionalisierte pNIPAM (A, B, C = 100 mg, 0.04 mmol) in einem ausgeheizten und mit Stickstoff gespülten Schraubdeckelgläschen mit Septum in 1 mL DMF gelöst und in eine Einwegspritze überführt. Das Gläschen wurde mit DMF nachgespült (A = 0.6 mL, B = 1.9 mL, C = 3.0 mL). Beide Lösungen wurde zeitgleich zur BLG-NCA-Lösung gegeben (Die Lösemittelmengen wurden so gewählt, dass die Konzentration in allen 3 Ansätzen 11.1 wt-% entsprach). Die Reaktionsmischung wurde dann für 7 Tage bei  $0^\circ\text{C}$  unter Stickstoff gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurden die Schlenkrohre geöffnet und Essigsäureanhydrid (1.5 eq., A = 125  $\mu\text{L}$ , B = 250  $\mu\text{L}$ , C = 375  $\mu\text{L}$ ) zugegeben. Die Polymere wurden in kaltem Diethylether ausgefällt, abzentrifugiert und mit Diethylether gewaschen. Die Polymere wurden für 2 Tage im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** A: 241 mg, B: 423 mg, C: 607 mg (Ausbeute 82-90 %) – weißer Feststoff

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, RT,  $\text{CDCl}_3:\text{TFA}$  (3:1)):  $\delta$  [ppm] 8.29 (NH); 7.18 (i); 4.96 (h); 4.04-3.82 (e+b); 2.54-2.06 (c-d & f-g); 1.08 (a) – vgl. Anhang 13



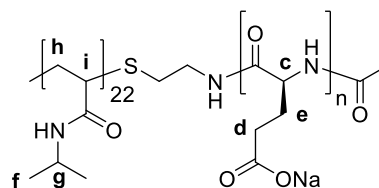
### 9.7.5 PGA-Na-*b*-pNIPAM

Die Synthese des PGA-Na-*b*-pNIPAM's erfolgte ausgehend von PBLG-*b*-pNIPAM analog zur Entschützung des Homopolypeptids PBLG mittels saurer Hydrolyse. Im Folgenden ist die Durchführung exemplarisch für das Blocklängenverhältnis PBLG : pNIPAM 3:1 gezeigt.

In einem Schlenkrohr wurde PBLG-*b*-pNIPAM (1.17 g,  $\approx 6.1$  mmol) vorgelegt und in 13.2 mL Trifluoressigsäure gelöst. Anschließend wurden vorsichtig 4.8 mL HBr-Lösung (33 %-ig in Essigsäure, 4.6 eq.) mit einer Pipette langsam zugetropft (starke Gasentwicklung). Die Gasentwicklung wurde über einen Blasenähler verfolgt. Nach Erliegen der Gasbildung wurde das Schlenkrohr verschlossen und die Reaktionsmischung für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das PGA-Na-*b*-pNIPAM in ca. 400 mL Diethylether unter starkem Rühren ausgefällt und für weitere 15 Minuten gerührt. Das PGA-Na-*b*-pNIPAM wurde abzentrifugiert und mit Diethylether gewaschen. Der Niederschlag wurde für 1.5 Stunden im Vakuum getrocknet, um überschüssigen Diethylether zu entfernen. Anschließend wurde das PGA-Na-*b*-pNIPAM mit 0.5 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung deprotoniert (30 min, 2.75 eq) und gegen 0.1 M NaCl-Lösung und destilliertes Wasser dialysiert. Nach Lyophilisation wurde das PGA-Na-*b*-pNIPAM erhalten.

**Ausbeute:** 880 mg, 101 % – weißer Feststoff

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, RT, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] 4.32 (c); 3.92 (g); 2.36-1.88 (d,e); 1.88-1.34 (h,i); 1.16 (f) – vgl. Anhang 14



### 9.7.6 Glycosylierung von PGA-Na-*b*-pNIPAM

Die Synthese der glycosylierten Blockcopolypeptide erfolgte analog zu der Funktionalisierung der Homopolypeptide nach der allgemeinen Synthesevorschrift 9.6.1. Für die Blockcopolymere wurden jedoch zunächst nur die zwei in Tabelle 9-18 gezeigten Stoffmengenverhältnisse verwendet. Als Aminozucker wurde über KOCHETKOV-Aminierung hergestelltes Glucosylamin verwendet.

Tabelle 9-18 eingesetzte Stoffmengenverhältnisse für die Glycosylierung von PGA-Na-*b*-pNIPAM

	Stoffmengenverhältnis [eq.]		
	PGA-Na	DMT-MM	Aminozucker
<b>Z 0.25</b>	1	0.25	0.5
<b>Z 1</b>	1	1.00	2.0

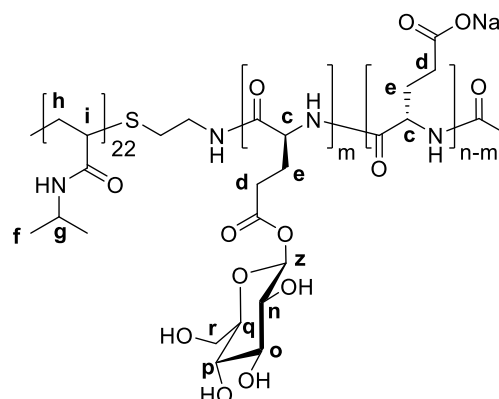
Eine Zusammenfassung der erhaltenen Substitutionsgrade für die unterschiedlichen Stoffmengenverhältnisse und unterschiedlichen Blocklängenverhältnisse (A-C) findet sich in Tabelle 9-19.

Tabelle 9-19 Ergebnisse der wässrigen Amidkupplung von  $\beta$ -D-Glucosylamin an PGA-Na-*b*-pNIPAM

Blocklängenverhältnis	Stoffmengenverhältnis	DS
A (1:1)	Z 1.00	0.55
B (2:1)	Z 0.25	0.19
B (2:1)	Z 1.00	0.63
C (3:1)	Z 0.25	0.19
C (3:1)	Z 1.00	0.56

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, RT,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] 4.96 (z); 4.30 (c); 3.88-3.36 (g/n,o,p,q,r); 2.57-1.88 (d/e); 1.88-1.31 (h/i); 1.13 (f); - exemplarisch für B (2:1), vgl. Anhang 15

Der Substitutionsgrad wurde aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum über die Integralverhältnisse der Peptidrückgrat-Protonen (c) im Verhältnis zum anomeren Proton des Glucoserests (z) bestimmt.



## 10 Literatur

- [1] H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 218, 1–27.
- [2] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.*, **1995**, 28, 321–327.
- [3] C. Bonduelle, S. Lecommandoux, *Biomacromolecules*, **2013**, 14, 2973–2983.
- [4] H.-J. Gabius, J. Roth, *Histochem. Cell Biol.*, **2016**, 147, 111–117.
- [5] Y. Miura, Y. Hoshino, H. Seto, *Chem. Rev.*, **2016**, 116, 1673–1692.
- [6] S. G. Spain, N. R. Cameron, *Polym. Chem.*, **2010**, 2, 60–68.
- [7] M. Danial, H.-A. Klok, *Macromol. Biosci.*, **2015**, 15, 9–35.
- [8] T. R. Branson, W. B. Turnbull, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 4613–4622.
- [9] B. Wang, G.-J. Boons, *Carbohydrate recognition: Biological problems, methods, and applications*, Hoboken, N.J., Wiley. **2011**.
- [10] H.-J. Gabius, *The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences*, 2<sup>nd</sup> edition, Weinheim, Wiley. **2011**.
- [11] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, *Molecular cell biology*, 4<sup>th</sup> edition, New York, NY [u.a.], Freeman. **2002**.
- [12] S. Lee-Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1984**, 81, 2708–2712.
- [13] S. Wildt, T. U. Gerngross, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2005**, 3, 119–128.
- [14] F. F. Nord, R. B. Merrifield, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology: Solid-Phase Peptide Synthesis*, Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc. **1969**.
- [15] H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1987**, 26, 294–308.
- [16] M. Cudic, G. D. Burstein, *Methods Mol. Biol. (N. Y.)*, **2008**, 494, 187–208.
- [17] Z. J. Witczak, R. Bielski, *Click chemistry in glycoscience: New developments and strategies*, Hoboken, N.J., Wiley. **2013**.
- [18] S. Kent, *J. Pept. Sci.*, **2003**, 9, 574–593.
- [19] Y. Miura, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2007**, 45, 5031–5036.



- [20] S. L. Mangold, M. J. Cloninger, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 2458–2465.
- [21] M. H. Sleiman, R. Csonka, C. Arbez-Gindre, G. A. Heropoulos, T. Calogeropoulou, M. Signorelli, A. Schiraldi, B. R. Steele, D. Fessas, M. Micha-Screttas, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, *80*, 692–701.
- [22] M. Byrne, R. Mildner, H. Menzel, A. Heise, *Macromol. Biosci.*, **2015**, *15*, 74–81.
- [23] R. Roy, P. V. Murphy, H.-J. Gabius, *Molecules*, **2016**, *21*, 629–665.
- [24] E. Mahon, Z. Mouline, M. Sillion, A. Gilles, M. Pinteala, M. Barboiu, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 3004–3006.
- [25] S. Kumar, B. Maiti, P. De, *Langmuir*, **2015**, *31*, 9422–9431.
- [26] C. Bonduelle, H. Oliveira, C. Gauche, J. Huang, A. Heise, S. Lecommandoux, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 11251–11254.
- [27] C. Gauche, S. Lecommandoux, *Polymer*, **2016**, *107*, 474–484.
- [28] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2001**, *47*, 113–131.
- [29] J. Huang, C. Bonduelle, J. Thévenot, S. Lecommandoux, A. Heise, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 119–122.
- [30] S. Das, D. K. Sharma, S. Chakrabarty, A. Chowdhury, S. Sen Gupta, *Langmuir*, **2015**, *31*, 3402–3412.
- [31] B. D. Polizzotti, K. L. Kiick, *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 483–490.
- [32] S. Liu, K. L. Kiick, *Macromolecules*, **2008**, *41*, 764–772.
- [33] A. Kobayashi, M. Goto, K. Kobayashi, T. Akaike, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **1995**, *6*, 325–342.
- [34] W. Chen, F. Meng, R. Cheng, C. Deng, J. Feijen, Z. Zhong, *J. Mater. Chem. B.*, **2015**, *3*, 2308–2317.
- [35] H. Leuchs, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1906**, *39*, 857–861.
- [36] H. Leuchs, W. Manasse, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1907**, *40*, 3235–3249.
- [37] H. Leuchs, W. Geiger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1908**, *41*, 1721–1726.
- [38] H. R. Kricheldorf, *Angew. Chem.*, **2006**, *118*, 5884–5917.

- [39] R. Mülhaupt, *Angew. Chem.*, **2004**, *116*, 1072–1080.
- [40] T. Curtius, W. Sieber, *Ber. dtsch. Chem. Ges. A/B*, **1921**, *54*, 1430–1437.
- [41] T. Curtius, W. Sieber, *Ber. dtsch. Chem. Ges. A/B*, **1922**, *55*, 1543–1558.
- [42] T. Curtius, K. Hochschwender, H. Meier, W. Lehmann, A. Benckiser, M. Schenck, W. Wirbatz, J. Gaier, W. Mühlhäusser, *J. Prakt. Chem.*, **1930**, *125*, 211–302.
- [43] F. Wessely, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1925**, *146*, 72–90.
- [44] F. Sigmund., F. Wessely, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1926**, *157*, 91–105.
- [45] F. Wessely, F. Sigmund, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1926**, *159*, 102–119.
- [46] F. Wessely, M. John, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1927**, *170*, 38–43.
- [47] J. Cheng, T. J. Deming, “Synthesis of Polypeptides by Ring-Opening Polymerization of  $\alpha$ -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides”, in *Peptide-Based Materials*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2012**, 1–26.
- [48] W. Vayaboury, O. Giani, H. Cottet, A. Deratani, F. Schué, *Macromol. Rapid Commun.*, **2004**, *25*, 1221–1224.
- [49] T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, *Biomacromolecules*, **2004**, *5*, 1653–1656.
- [50] T. J. Deming, “Polypeptide and Polypeptide Hybrid Copolymer Synthesis via NCA Polymerization”, in *Peptide Hybrid Polymers*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **2006**, 1–18.
- [51] G. J. M. Habraken, M. Peeters, Dietz, Carin H. J. T., C. E. Koning, A. Heise, *Polym. Chem.*, **2010**, *1*, 514–524.
- [52] K. Wang, L. Liang, S. Lin, X. He, *Eur. Polym. J.*, **2008**, *44*, 3370–3376.
- [53] M. Stern, *Synthese und Charakterisierung von speziellen makromolekularen Architekturen basierend auf Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamat) als stäbchenförmiges Modellpolymer*, Braunschweig, Dissertation, TU Braunschweig, **2013**.
- [54] T. Stukenkemper, Jansen, J. F. G. A., C. Lavilla, A. A. Dias, D. F. Brougham, A. Heise, *Polym. Chem.*, **2017**, *8*, 828–832.
- [55] M. I. Gibson, N. R. Cameron, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, **2009**, *47*, 2882–2891.

- [56] H. Lu, J. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 14114–14115.
- [57] I. Dimitrov, H. Schlaad, *Chem. Commun.*, **2003**, *9*, 2944–2945.
- [58] J.-F. Lutz, D. Schütt, S. Kubowicz, *Macromol. Rapid Commun.*, **2005**, *26*, 23–28.
- [59] W. Vayaboury, O. Giani, H. Cottet, S. Bonaric, F. Schué, *Macromol. Chem. Phys.*, **2008**, *209*, 1628–1637.
- [60] T. J. Deming, *Nature*, **1997**, *390*, 386–389.
- [61] T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 4240–4241.
- [62] T. J. Deming, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, **2000**, *38*, 3011–3018.
- [63] J. Huang, A. Heise, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 7373–7390.
- [64] K.-S. Krannig, H. Schlaad, *Soft matter*, **2014**, *10*, 4228–4235.
- [65] T. J. Deming, *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 786–808.
- [66] M. Zelzer, A. Heise, *Polym. Chem.*, **2013**, *4*, 3896–3904.
- [67] M. Zelzer, A. Heise, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2014**, *52*, 1228–1236.
- [68] A. Canning, A. Pasquazi, M. Fijten, S. Rajput, L. Buttery, J. W. Aylott, M. Zelzer, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2016**, *54*, 2331–2336.
- [69] K. Aoi, K. Tsutsumiuchi, M. Okada, *Macromolecules*, **1994**, *27*, 875–877.
- [70] J. R. Kramer, T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 15068–15071.
- [71] A. Y. Shaikh, S. Das, D. Pati, V. Dhaware, S. Sen Gupta, S. Hotha, *Biomacromolecules*, **2014**, *15*, 3679–3686.
- [72] J. Huang, G. Habraken, F. Audouin, A. Heise, *Macromolecules*, **2010**, *43*, 6050–6057.
- [73] C. Xiao, C. Zhao, P. He, Z. Tang, X. Chen, X. Jing, *Macromol. Rapid Commun.*, **2010**, *31*, 991–997.
- [74] H. Tang, D. Zhang, *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 1585–1592.
- [75] A. J. Rhodes, T. J. Deming, *ACS Macro Lett.*, **2013**, *2*, 351–354.
- [76] J. Sun, H. Schlaad, *Macromolecules*, **2010**, *43*, 4445–4448.
- [77] K.-S. Krannig, H. Schlaad, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 18542–18545.

- [78] L. McSweeney, F. Dénès, E. M. Scanlan, *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 2016, 2080–2095.
- [79] G. J. M. Habraken, C. E. Koning, J. P. A. Heuts, A. Heise, *Chem. Commun.*, **2009**, 24, 3612–3614.
- [80] J. R. Kramer, T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 4112–4115.
- [81] P. Midoux, C. Mendes, A. Legrand, J. Raimond, R. Mayer, M. Monsigny, A. C. Roche, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 871–878.
- [82] R. Wang, N. Xu, F.-S. Du, Z.-C. Li, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 3902–3904.
- [83] Z. Tian, M. Wang, A.-y. Zhang, Z.-g. Feng, *Polymer*, **2008**, 49, 446–454.
- [84] J. Jacobs, N. Gathergood, J. P. A. Heuts, A. Heise, *Polym. Chem.*, **2015**, 6, 4634–4640.
- [85] Y. Wang, K. L. Kiick, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 16392–16393.
- [86] S. Y. C. Wong, G. R. Guile, T. W. Rademacher, R. A. Dwek, *Glycoconjugate J.*, **1993**, 10, 227–234.
- [87] C. J. Cara, D. Skropeta, *Tetrahedron*, **2015**, 71, 9357–9365.
- [88] T. Akaike, I. Kitada, M. Kunou, *Galactosamine substitute of poly- $\omega$ -substituted-L-glutamic acid (or aspartic acid)*, Patentschrift, Veröffentlichungsnummer: 07/690496, **1991**.
- [89] X. Zeng, T. Murata, H. Kawagishi, T. Usui, K. Kobayashi, *Carbohydr. Res.*, **1998**, 312, 209–217.
- [90] K. Kobayashi, E. Tawada, T. Akaike, T. Usui, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **1997**, 1336, 117–122.
- [91] X. Zeng, T. Murata, H. Kawagishi, T. Usui, K. Kobayashi, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **1998**, 62, 1171–1178.
- [92] R. Mildner, H. Menzel, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2013**, 51, 3925–3931.
- [93] R. Mildner, H. Menzel, *Biomacromolecules*, **2014**, 15, 4528–4533.
- [94] C. Lavilla, M. Byrne, A. Heise, *Macromolecules*, **2016**, 49, 2942–2947.
- [95] C. Gerke, M. F. Ebbesen, D. Jansen, S. Boden, T. Freichel, L. Hartmann, *Biomacromolecules*, **2017**, 18, 787–796.

- [96] H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 637–674.
- [97] I. J. Goldstein, R. Iyer, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **1966**, 121, 197–200.
- [98] N. Sharon, *Glycobiology*, **2004**, 14, 53R–62R.
- [99] F. A. Quiñocho, *Pure and Appl. Chem.*, **1989**, 61, 1293–1306.
- [100] E. Senkara-Barwíjuk, T. Kobiela, K. Lebed, M. Lekka, *Biosens. Bioelectron.*, **2012**, 36, 103–109.
- [101] I. A. Rose, K. R. Hanson, K. D. Wilkinson, M. J. Wimmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1980**, 77, 2439–2441.
- [102] R. T. Lee, Y. C. Lee, *Glycoconjugate J.*, **2000**, 17, 543–551.
- [103] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 555–578.
- [104] Y. Gou, S.-J. Richards, D. M. Haddleton, M. I. Gibson, *Polym. Chem.*, **2012**, 3, 1634–1640.
- [105] W. E. Hanby, S. G. Waley, J. Watson, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3239–3249.
- [106] E. R. Blout, A. Asadourian, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 955–961.
- [107] E. R. Blout, R. H. Karlson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 941–946.
- [108] J. Han, J. Ding, Z. Wang, S. Yan, X. Zhuang, X. Chen, J. Yin, *Sci. China Chem.*, **2013**, 56, 729–738.
- [109] P. Doty, A. Wada, J. T. Yang, E. R. Blout, *J. Polym. Sci.*, **1957**, 23, 851–861.
- [110] R. Kuhn, H. H. Baer, W. Bister, R. Brossmer, A. Gauhe, H. J. Haas, F. Haber, G. Krüger, H. Tiedemann, D. Weiser, *Angew. Chem.*, **1957**, 69, 23–33.
- [111] L. M. Likhoshesterov, O. S. Novikova, V. A. Derevitskaja, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, **1986**, 146, C1–C5.
- [112] E. R. Blout, M. Idelson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 497–498.
- [113] M. Idelson, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 4631–4634.
- [114] J. Babin, D. Taton, M. Brinkmann, S. Lecommandoux, *Macromolecules*, **2008**, 41, 1384–1392.

- [115] C. P. Swaminathan, D. Gupta, V. Sharma, A. Surolia, *Biochemistry*, **1997**, 36, 13428–13434.
- [116] J. R. Kramer, T. J. Deming, *Polym. Chem.*, **2014**, 5, 671–682.
- [117] X. Zhang, V. K. Yadavalli, *Anal. Chim. Acta.*, **2009**, 649, 1–7.
- [118] D. Vetter, M. A. Gallop, *Bioconjugate Chem.*, **1995**, 6, 316–318.
- [119] M. Kunishima, C. Kawachi, K. Hioki, K. Terao, S. Tani, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 1551–1558.
- [120] M. Kunishima, C. Kawachi, F. Iwasaki, K. Terao, S. Tani, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 5327–5330.
- [121] M. Kunishima, C. Kawachi, J. Monta, K. Terao, F. Iwasaki, S. Tani, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 13159–13170.
- [122] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. Edition, Stuttgart, Thieme. **2011**.
- [123] N. Lotan, A. Yaron, A. Berger, *Biopolymers*, **1966**, 4, 365–368.
- [124] R. Mildner, *Synthese und Struktur von pH-responsiven Glycopolypeptiden*, Braunschweig, Dissertation, TU Braunschweig, **2015**.
- [125] N. Kobayashi, A. Muranaka, J. Mack, *Circular dichroism and magnetic circular dichroism spectroscopy for organic chemists*, Cambridge, RSC Pub. **2012**.
- [126] N. Berova, K. Nakanishi, R. Woody, *Circular dichroism: Principles and applications*, 2. Edition, New York, Wiley-VCH. **2000**.
- [127] M. L. Tiffany, S. Krimm, *Biopolymers*, **1969**, 8, 347–359.
- [128] N. J. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry*, **1969**, 8, 4108–4116.
- [129] J. Applequist, P. Doty, *Polyamino acids, Polypeptides, and Proteins:  $\alpha$ -Helix Formation in Poly- $\epsilon$ -Carbobenzoxy-L-Lysine and Poly-L-Lysine*, Madison, The University of Wisconsin Press. **1962**.
- [130] S. Tanaka, A. Nakajima, *Polym J.*, **1970**, 1, 505–517.
- [131] E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 950A–959A.

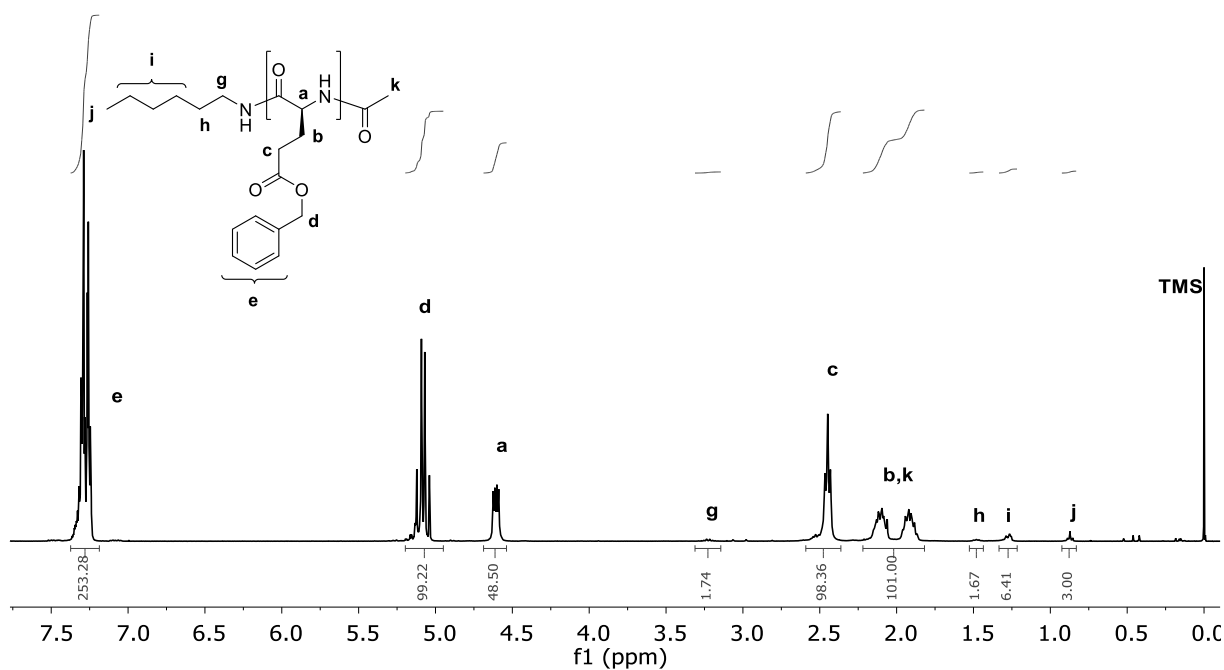
- [132] C. W. Cairo, J. E. Gestwicki, M. Kanai, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 1615–1619.
- [133] M. Islam Khan, D. K. Mandal, C. Brewer, *Carbohydr. Res.*, **1991**, *213*, 69–77.
- [134] D. K. Mandal, C. F. Brewer, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 12602–12609.
- [135] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, *Protein Sci.*, **1995**, *4*, 2411–2423.
- [136] Z. Derewenda, J. Yariv, J. R. Helliwell, A. J. Kalb, Dodson E. J., Papiz M. Z., T. Wan, J. Campbell, *EMBO J.*, **1989**, *8*, 2189–2193.
- [137] X. Wang, E. Matei, A. M. Gronenborn, O. Ramström, M. Yan, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 4248–4252.
- [138] W. B. Turnbull, A. H. Daranas, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14859–14866.
- [139] Malvern Instruments Limited, *MicroCal ITC Systems: understanding biomolecular interactions*. **2016**, <http://www.malvern.com/Assets/MRK2058.pdf>.
- [140] T. K. Dam, M. L. Talaga, N. Fan, C. F. Brewer, *Methods Enzymol.*, **2016**, *567*, 71–95.
- [141] I. J. Goldstein, C. E. Hollerman, E. E. Smith, *Biochemistry*, **1965**, *4*, 876–883.
- [142] D. K. Mandal, N. Kishore, C. F. Brewer, *Biochemistry*, **1994**, *33*, 1149–1156.
- [143] Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, F. Albertini, S. Fukushima, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, *ACS nano*, **2014**, *8*, 6724–6738.
- [144] J. Rodriguez-Hernandez, S. Lecommandoux, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2026–2027.
- [145] Y. P. Myer, *Macromolecules*, **1969**, *2*, 624–628.
- [146] A. Punnia-Moorthy, *J. Oral Pathol*, **1987**, *16*, 36–44.
- [147] K. H. Steen, A. E. Steen, P. W. Reeh, *J. Neurosci.*, **1995**, *15*, 3982–3989.
- [148] C. Zhao, X. Zhuang, C. He, X. Chen, X. Jing, *Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, *29*, 1810–1816.
- [149] G. J. M. Habraken, C. E. Koning, A. Heise, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2009**, *47*, 6883–6893.
- [150] Malvern Instruments Limited, *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 minutes*, online. **2016**, TN101104 Dynamic Light Scattering Introduction.

- [151] Malvern Instruments Limited, *Zeta potential - An introduction in 30 minutes*, online. **2016**, TN101104 Zeta Potential Introduction.
- [152] S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam, P. Schuck, *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 5066–5073.
- [153] H. Zhao, G. Piszczek, P. Schuck, *Methods*, **2015**, 76, 137–148.

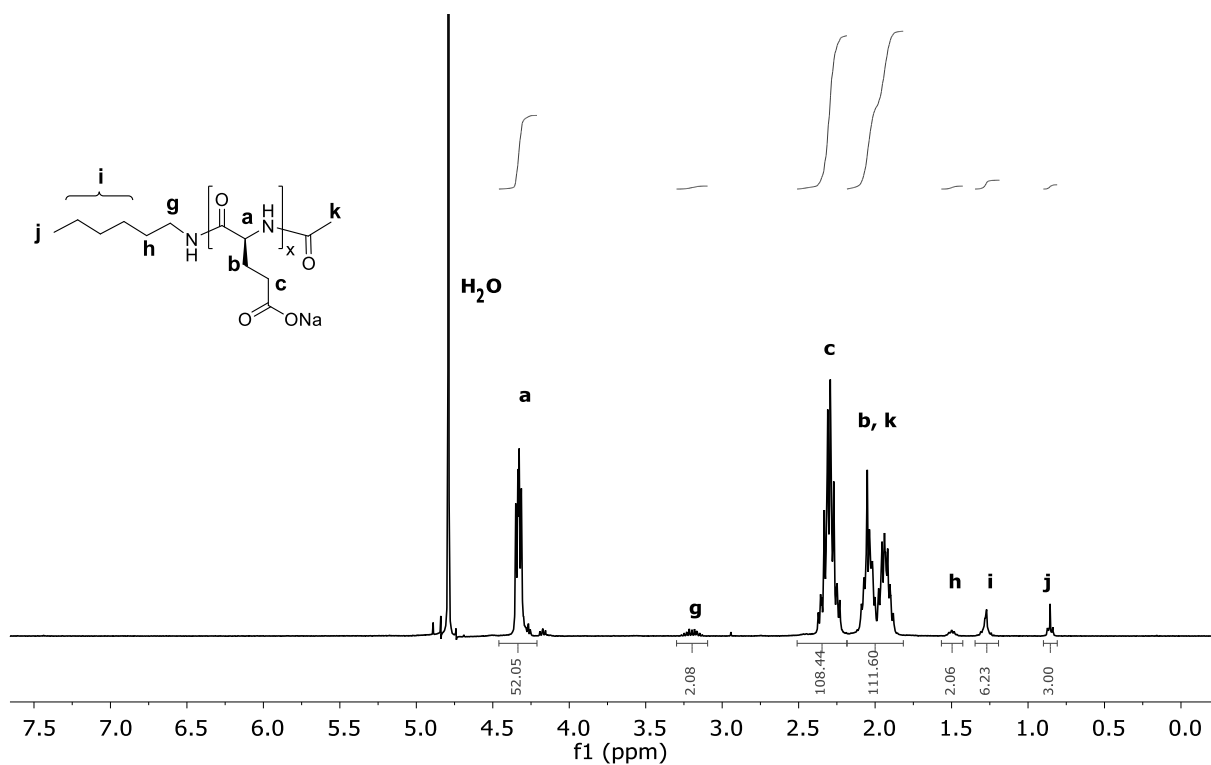


# 11 Anhang

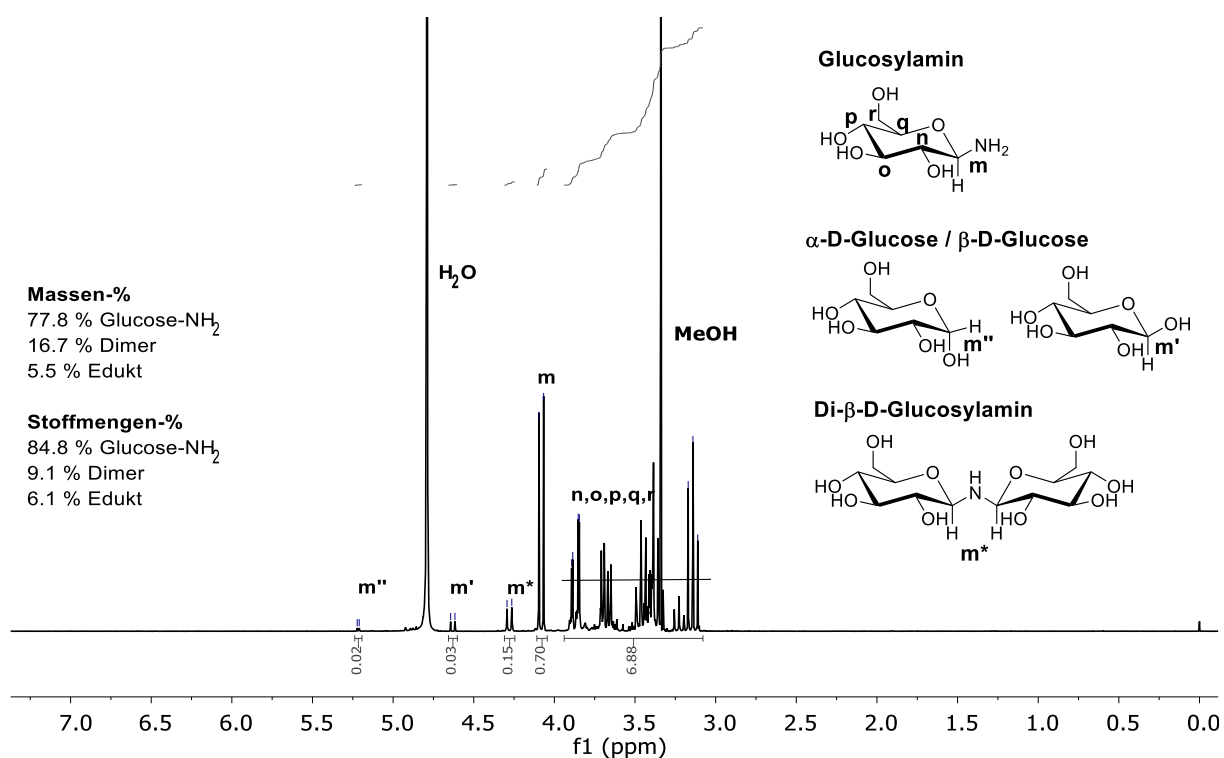
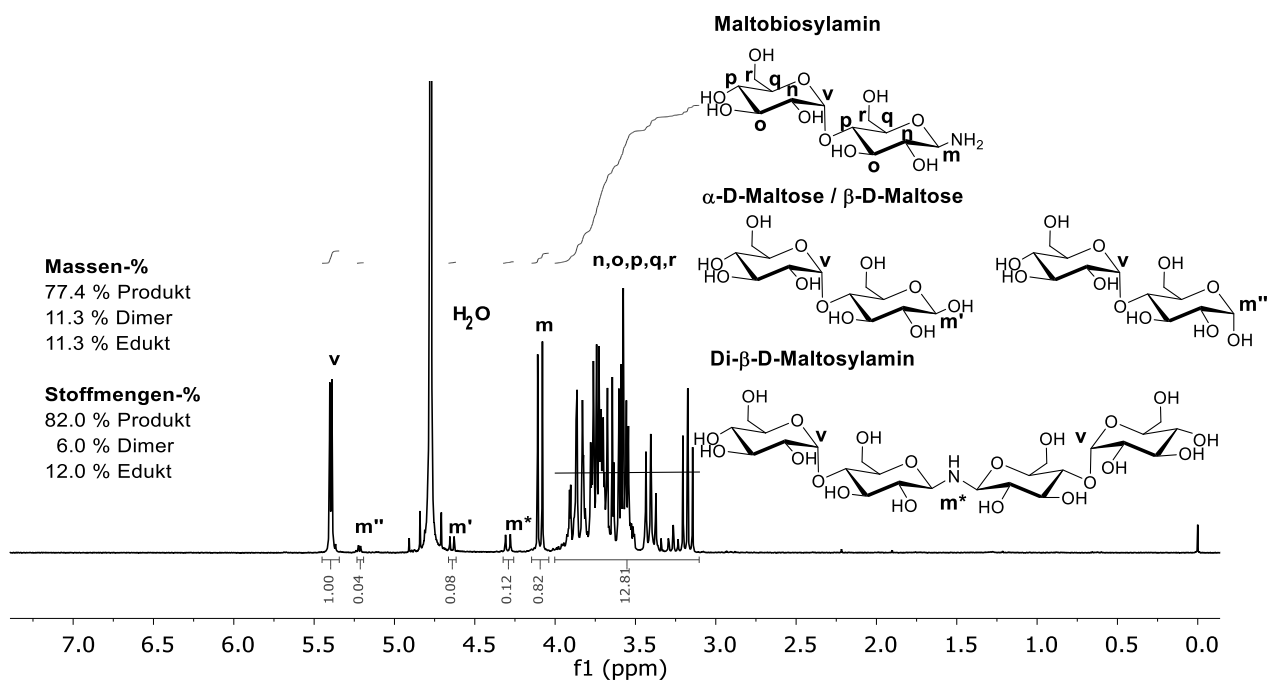
## <sup>1</sup>H-NMR-Spektren

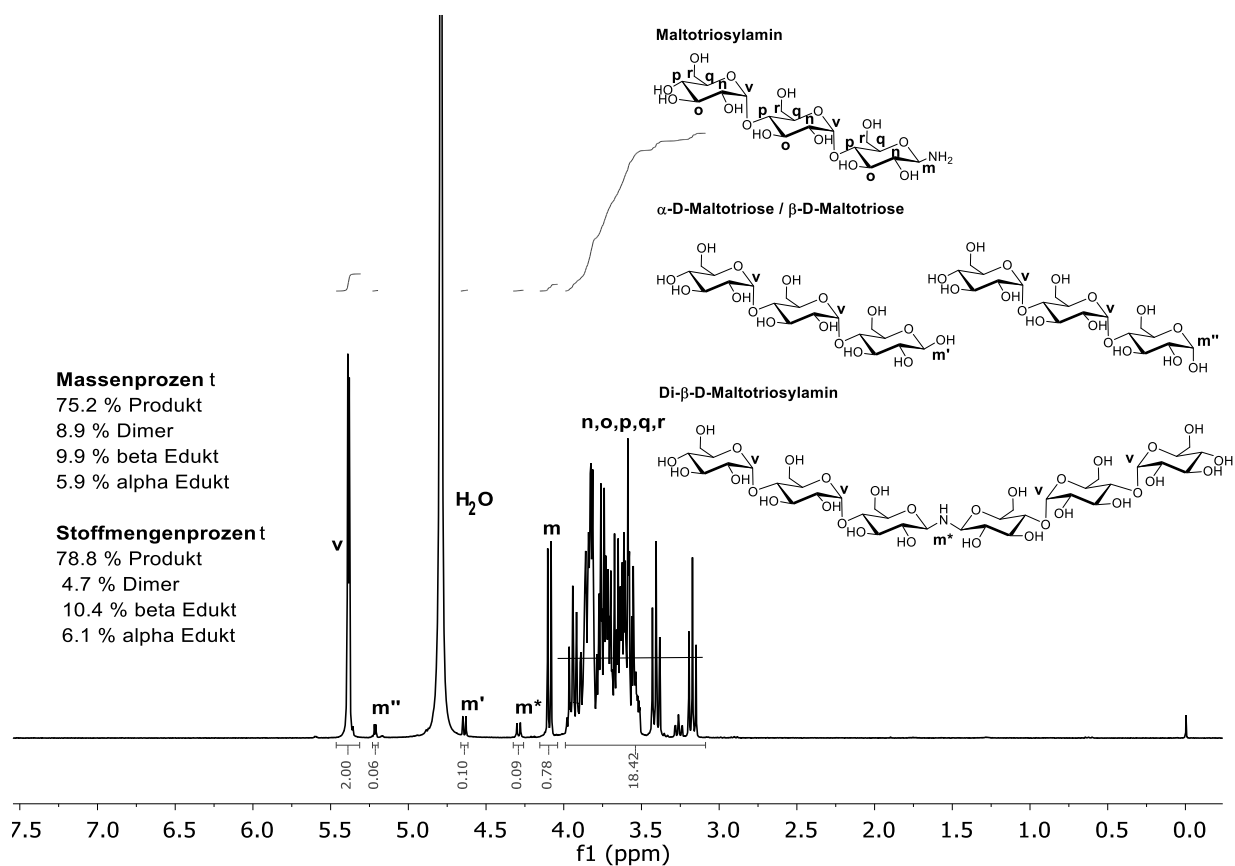
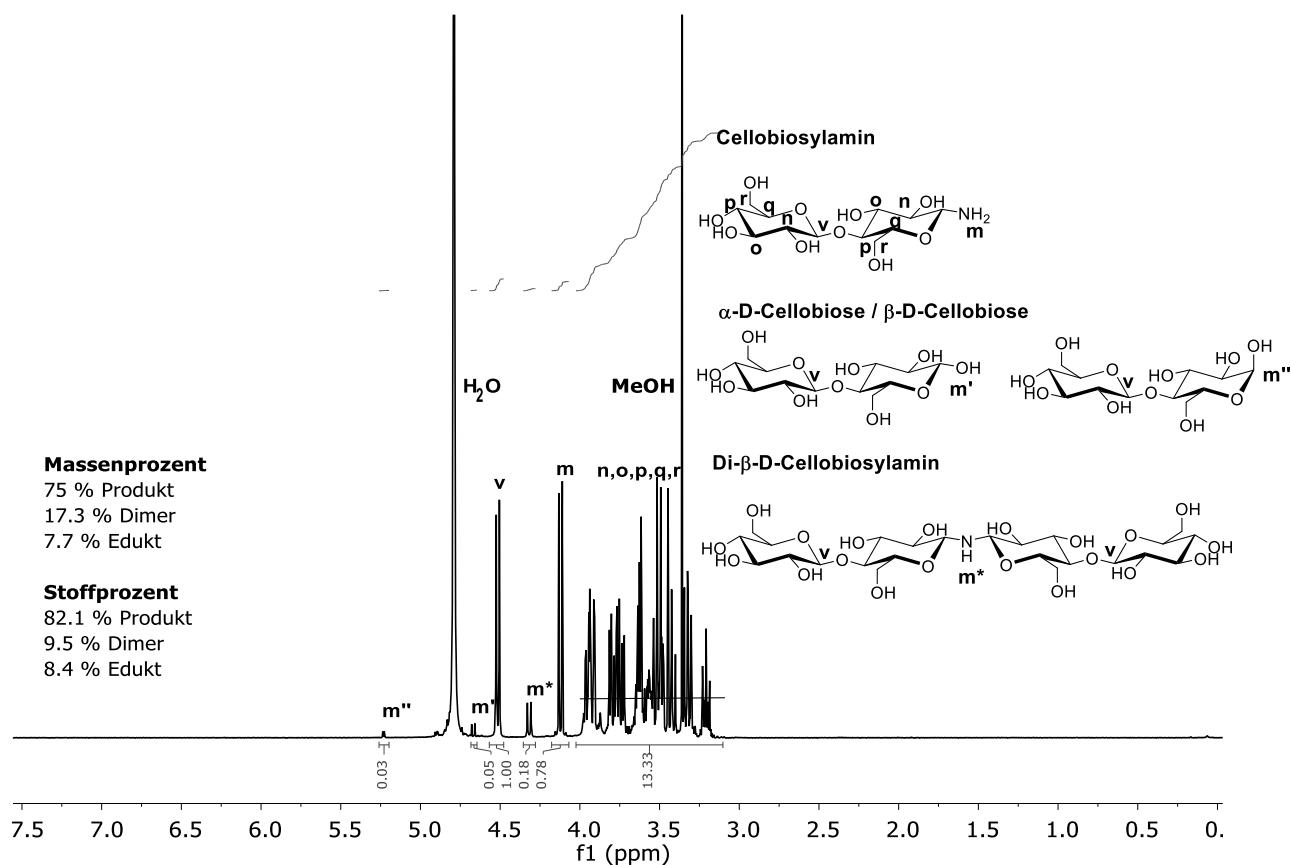


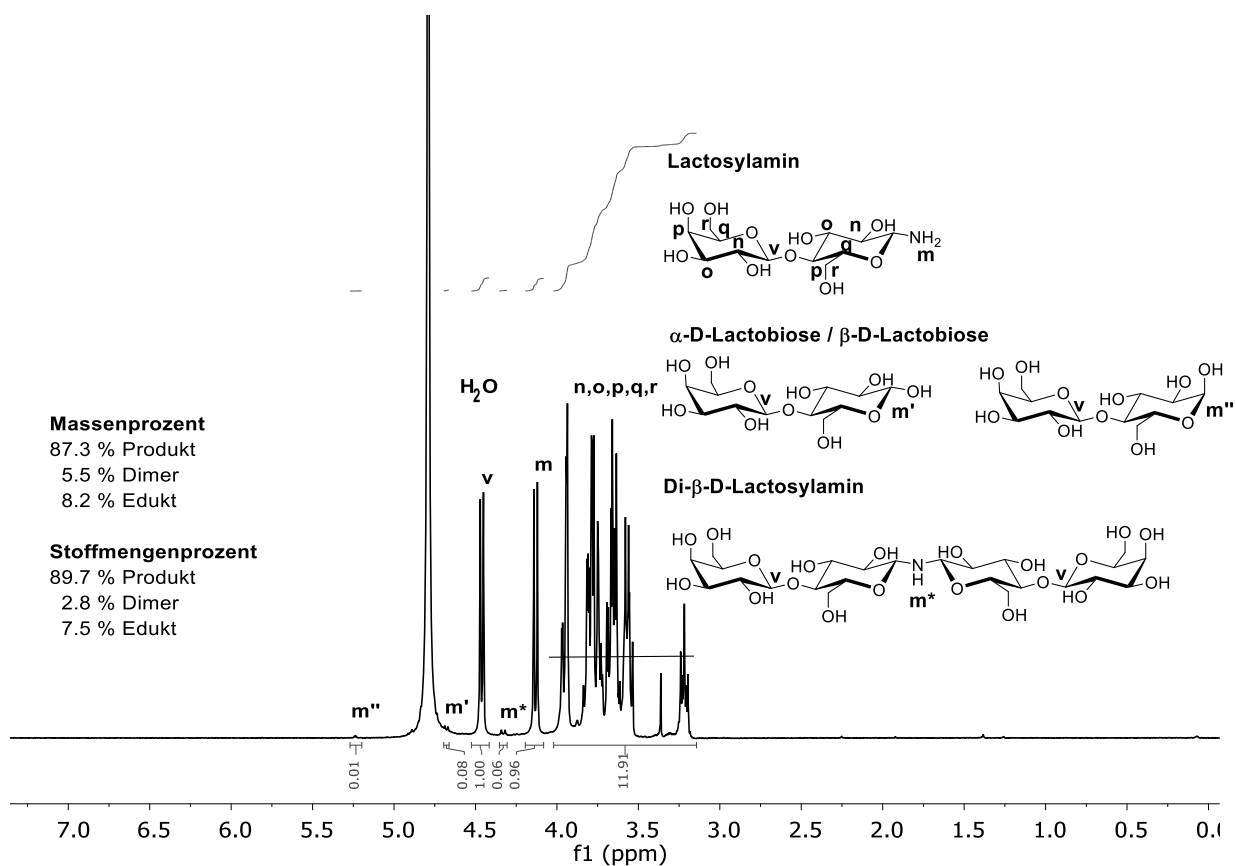
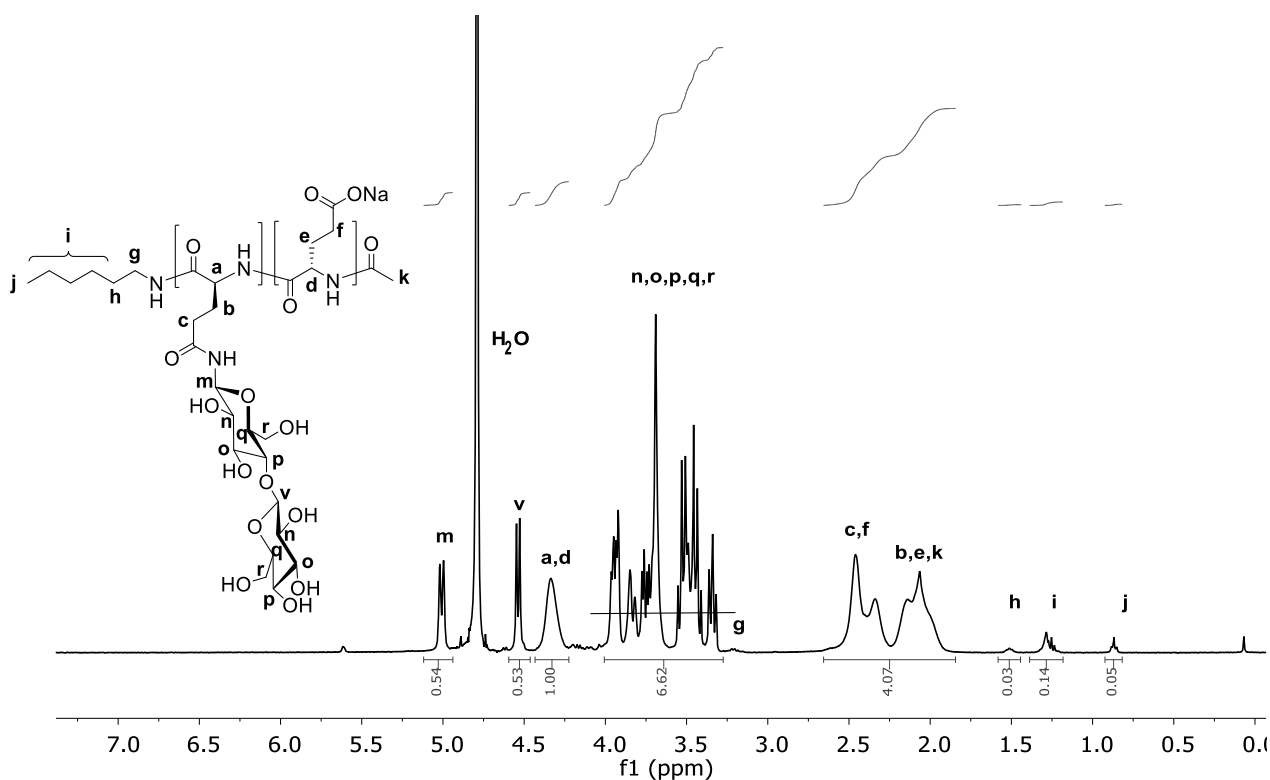
Anhang 1 <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von PBLG in CDCl<sub>3</sub>/TFA-d (3:1) (400 MHz, RT) – PBLG 6

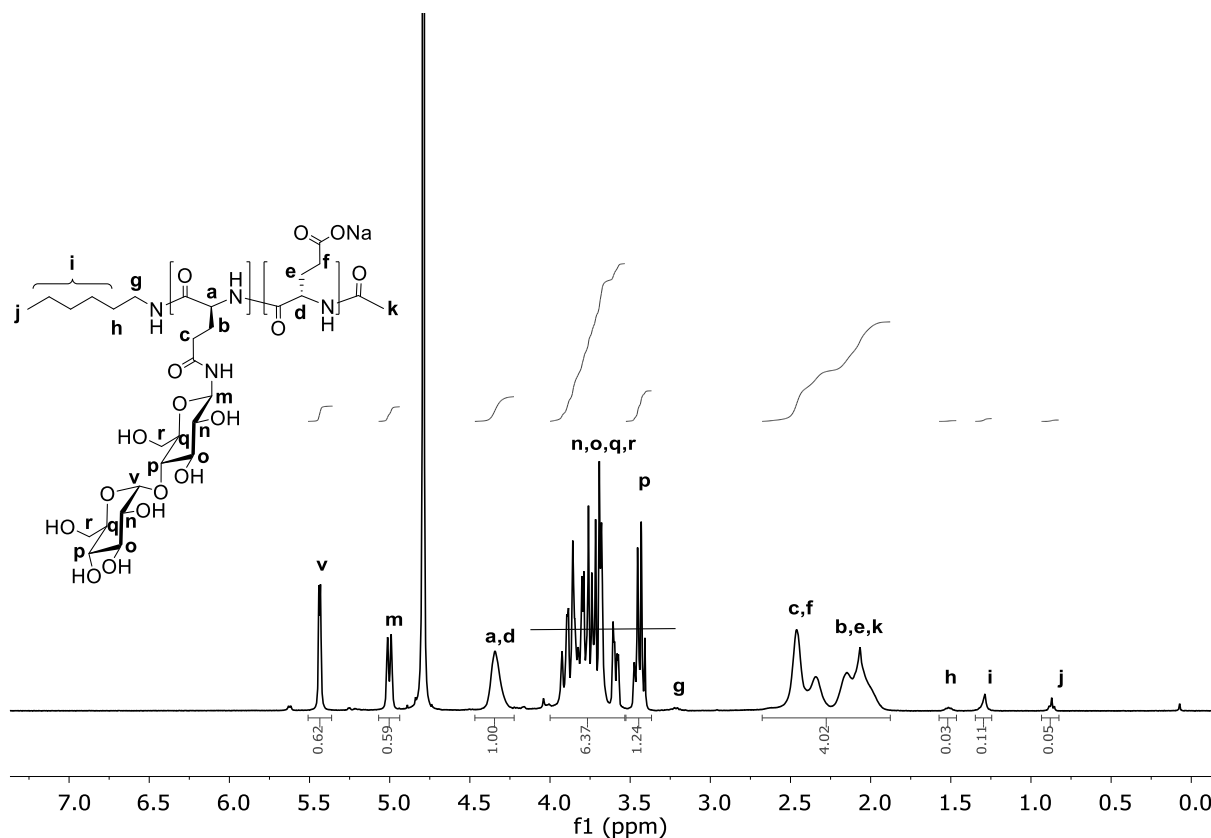
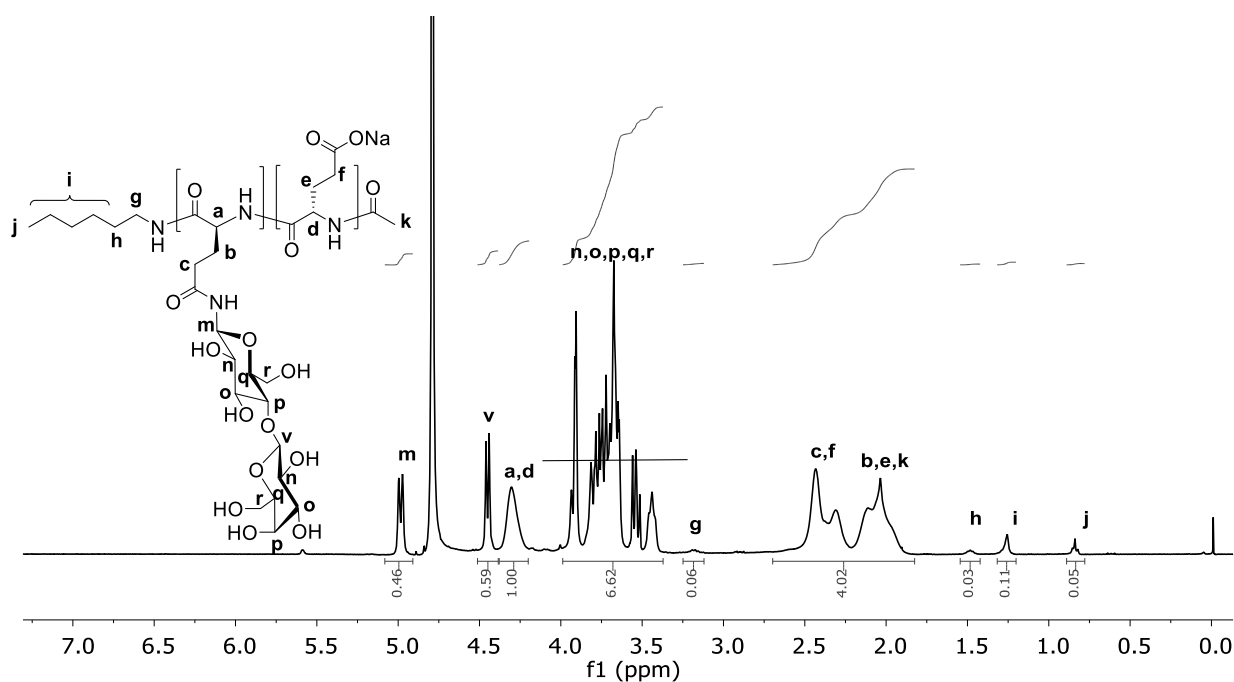


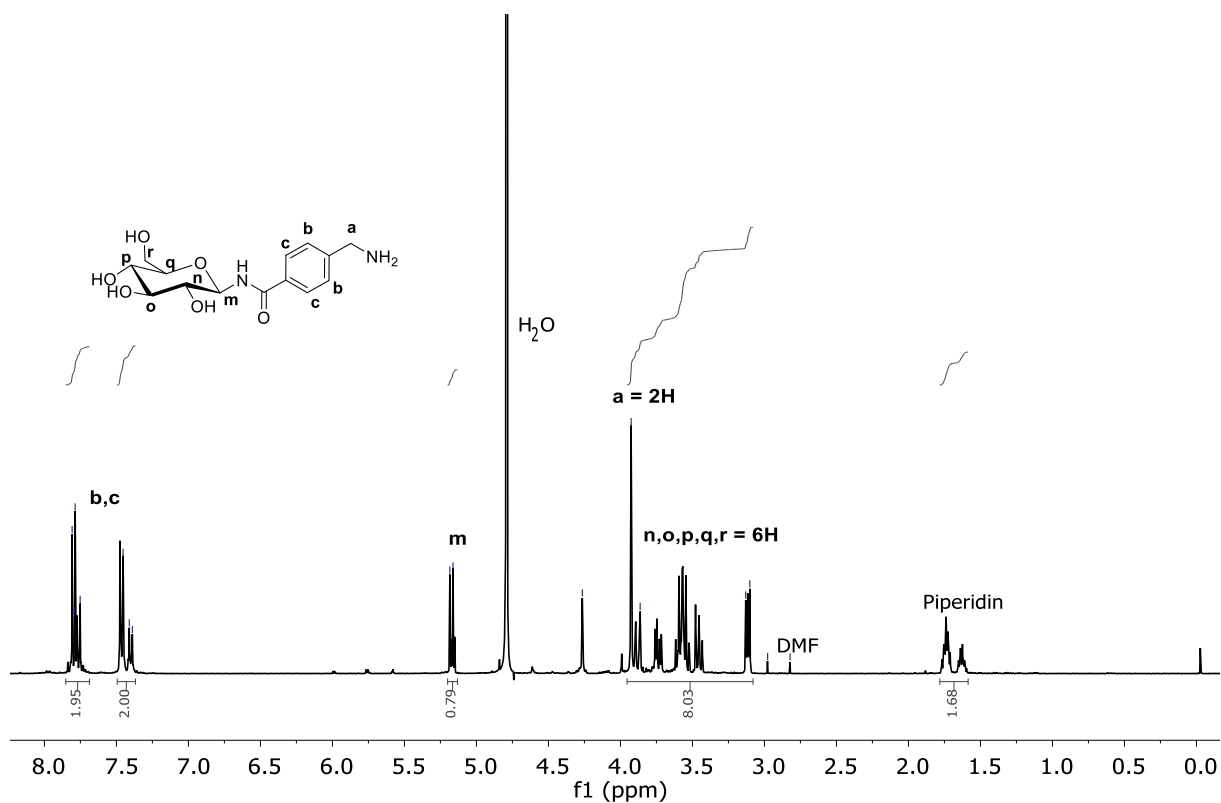
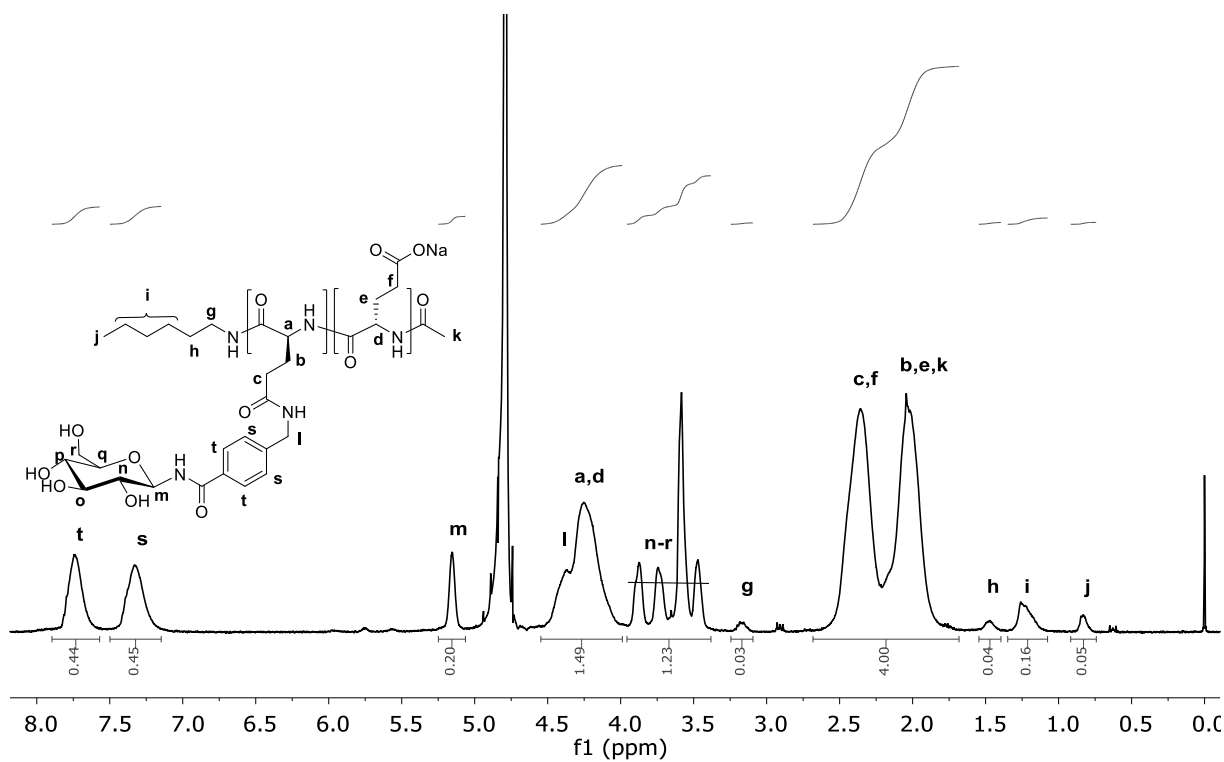
Anhang 2 <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von PGA-Na in D<sub>2</sub>O (400 MHz, RT) – PGA 3

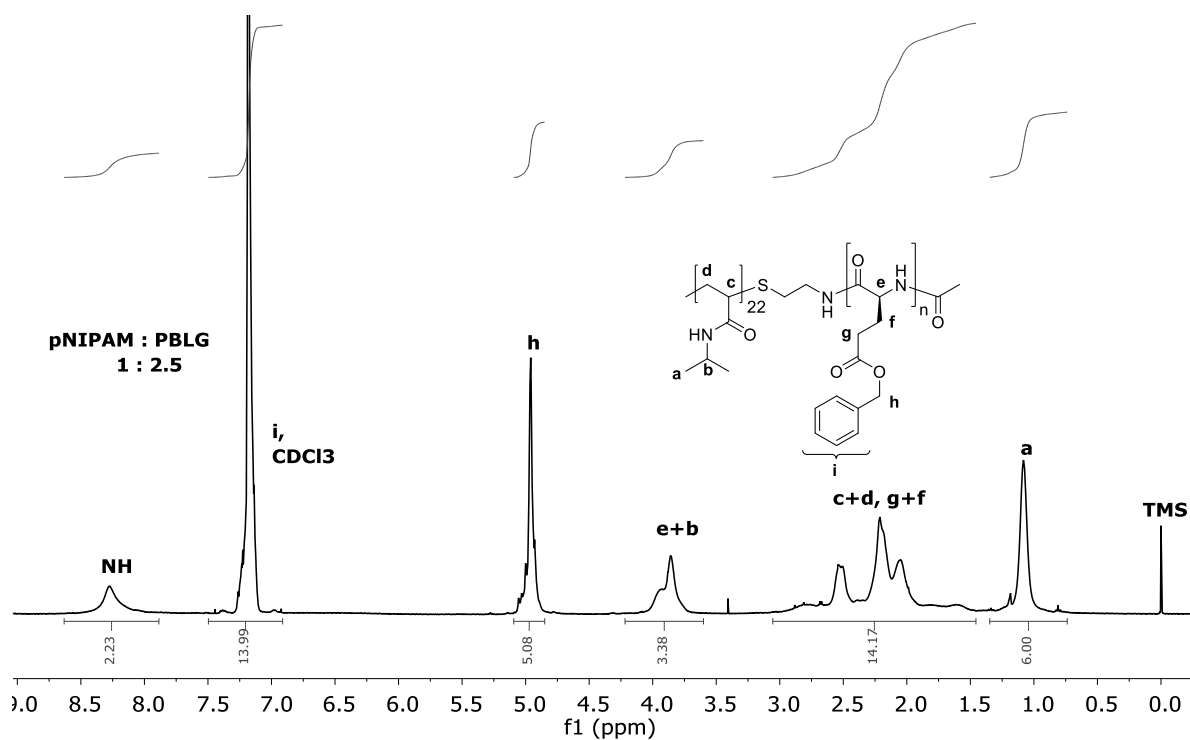
Anhang 3 <sup>1</sup>H-NMR Spektrum vom Glucosylamin Rohprodukt in D<sub>2</sub>O (400 MHz, RT)Anhang 4 <sup>1</sup>H-NMR Spektrum vom Maltobiosylamin Rohprodukt in D<sub>2</sub>O (400 MHz, RT)

Anhang 5  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum vom Maltotriosylamin Rohprodukt in  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz, RT)Anhang 6  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum vom Cellobiosylamin Rohprodukt in  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz, RT)

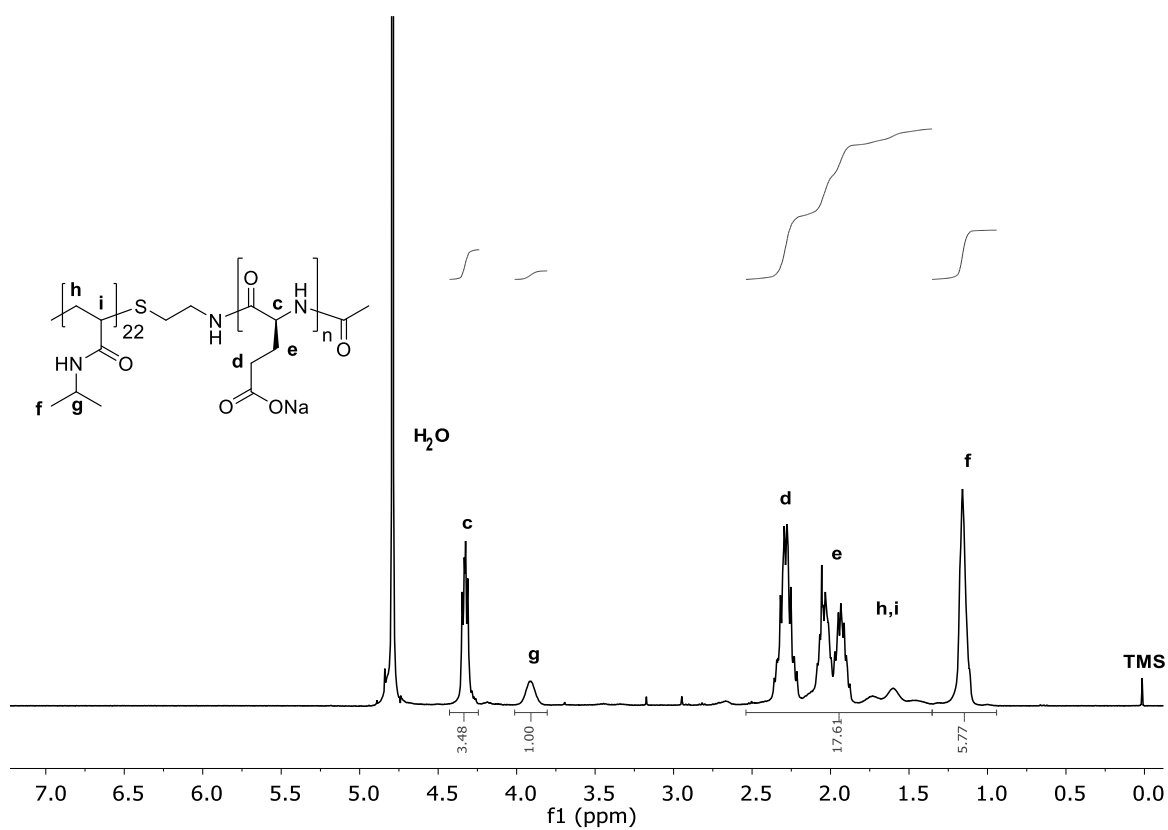
Anhang 7  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum vom Lactosylamin Rohprodukt in  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz, RT)Anhang 8  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von PGA-Cellobiose (DP 60, DS 0.55) in  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz, RT)

Anhang 9  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von PGA-Maltobiose (DP 56, DS 0.64) in  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz, RT)Anhang 10  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von PGA-Lactose (DP 54, DS 0.54) in  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz, RT)

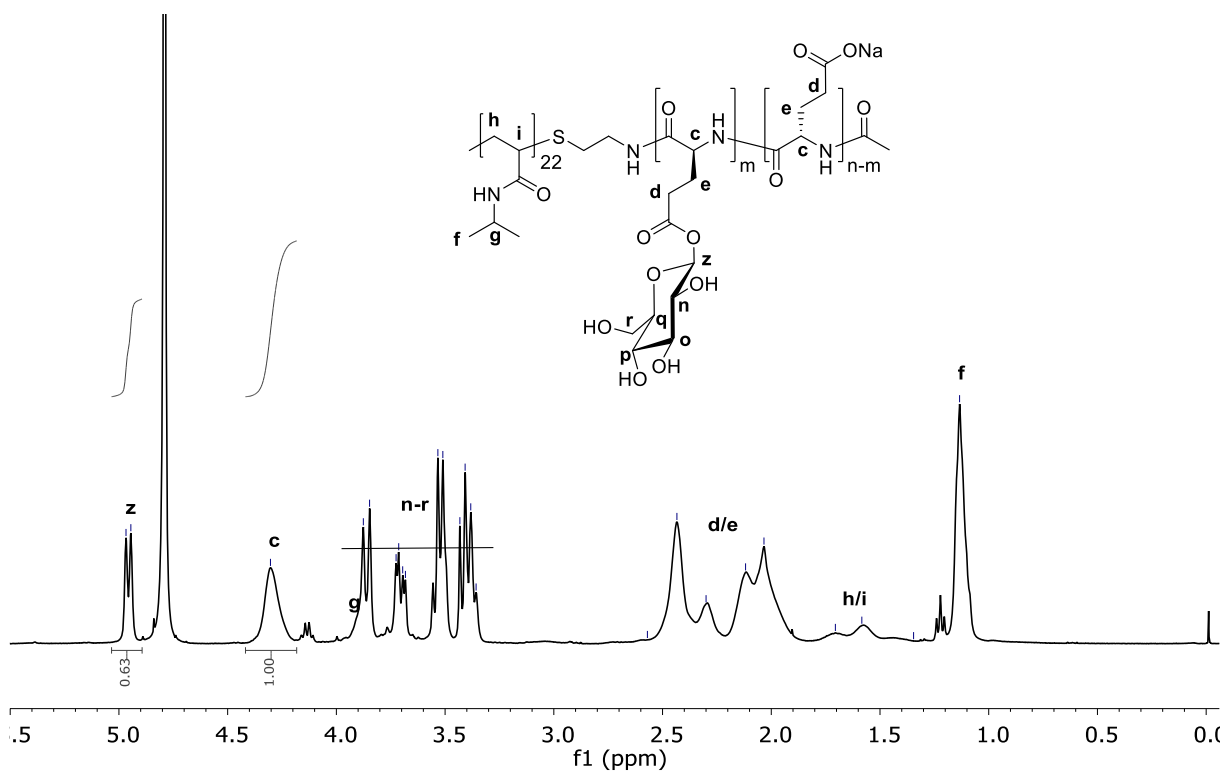
Anhang 11  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von *N*-(4-(Aminomethyl)benzoyl)- $\beta$ -D-glucosylamin in  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz, RT)Anhang 12  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von PGA-Car-Glucose (DP 56, DS 0.23) in  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz, RT)



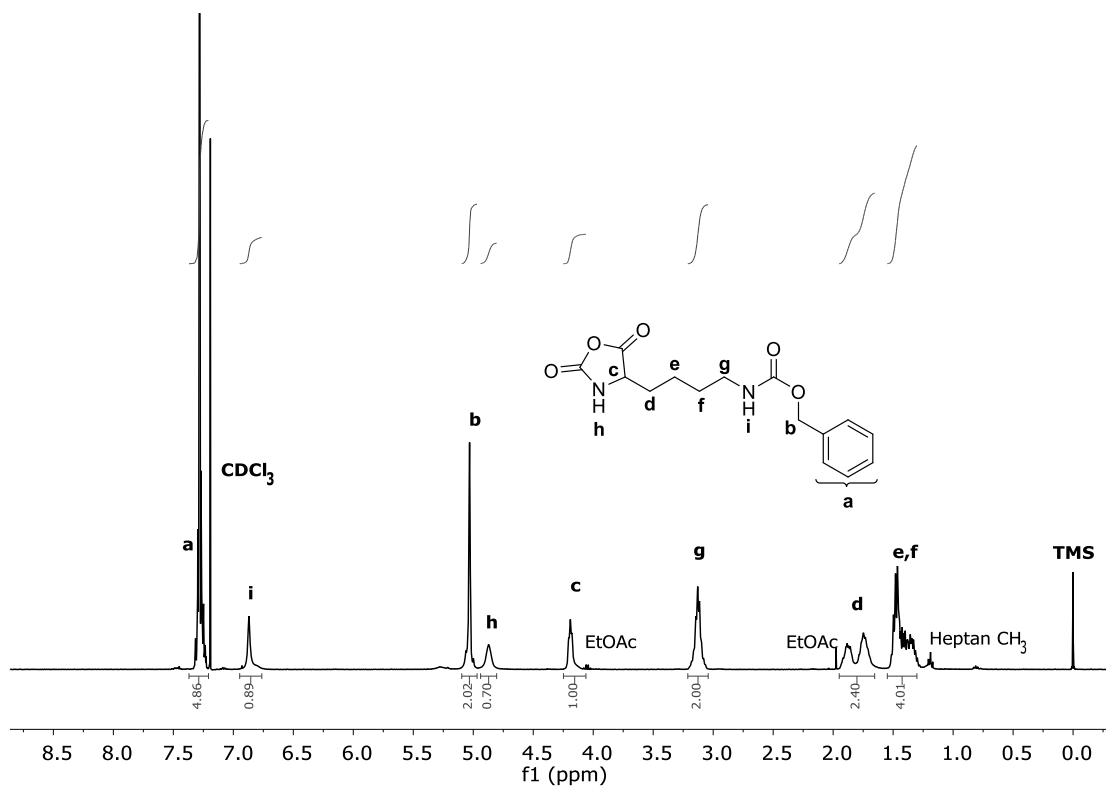
Anhang 13 <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von PBLG-*b*-pNIPAM in CDCl<sub>3</sub> + TFA (3:1) (+TMS) (400 MHz, RT)



Anhang 14 <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von PGA-Na-*b*-pNIPAM in D<sub>2</sub>O (+DSS) (400 MHz, RT)

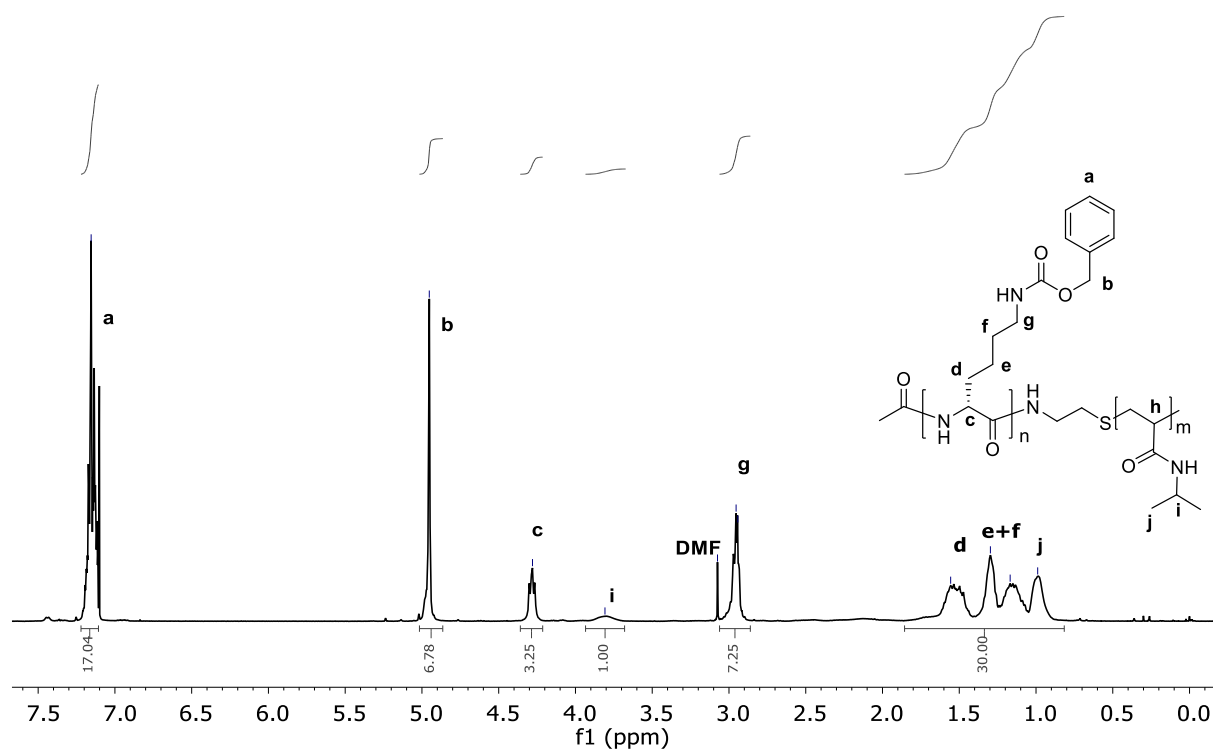
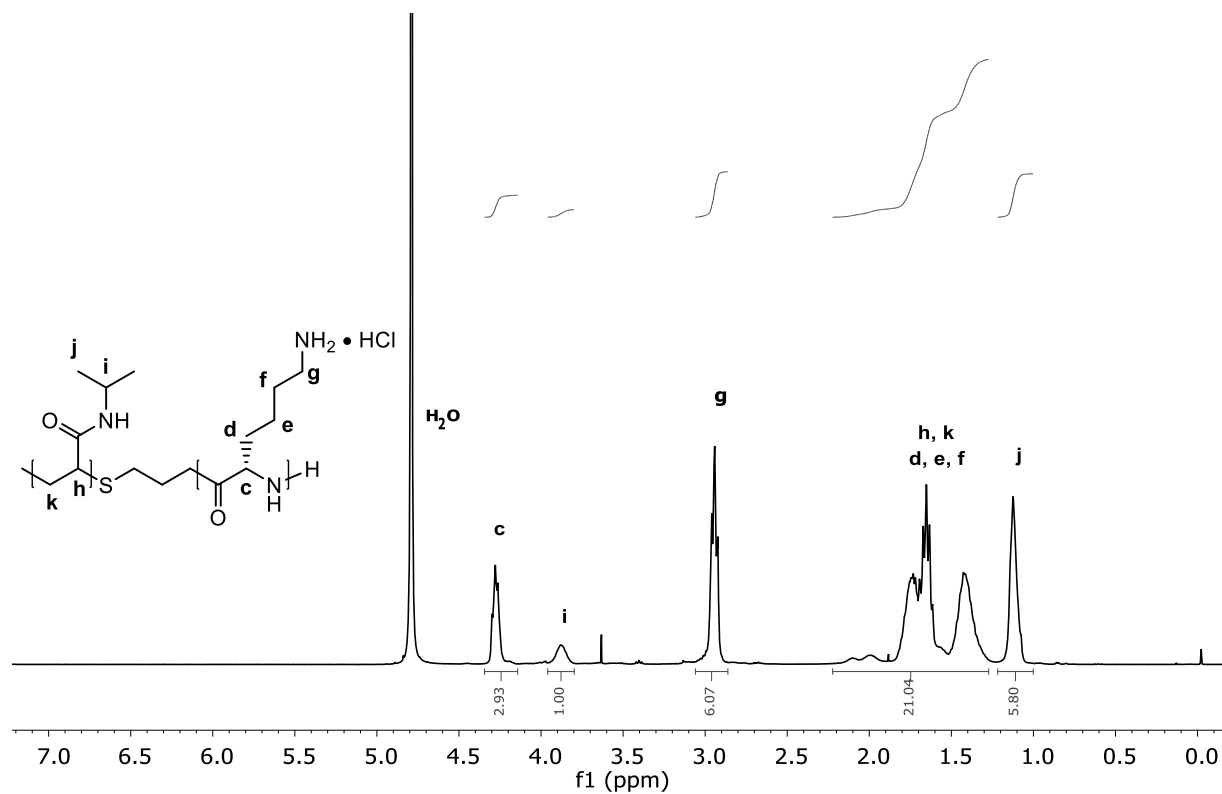


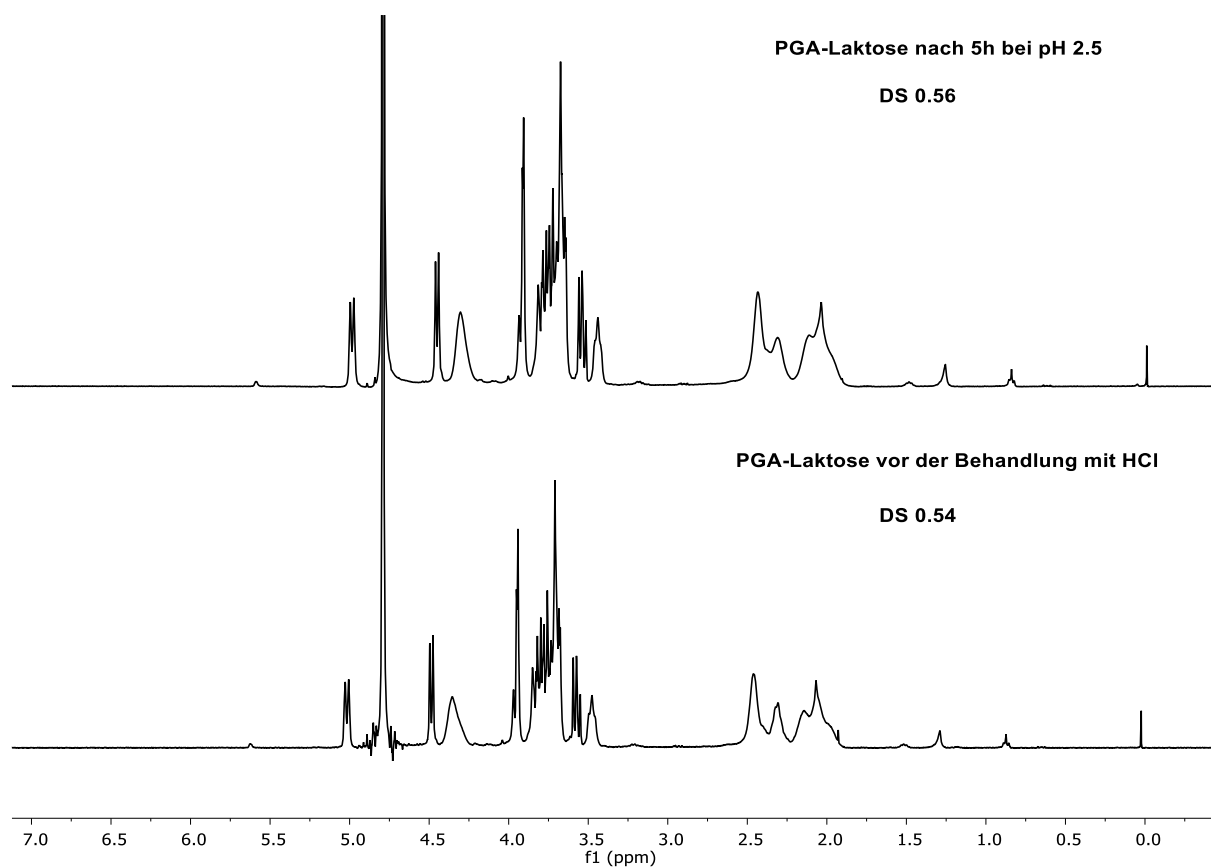
Anhang 15  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von glycosyliertem PGA-Na-b-pNIPAM (Blocklängenverhältnis 2:1, DS Glucose 0.63) in  $\text{D}_2\text{O}$  (+DSS) (400 MHz, RT)



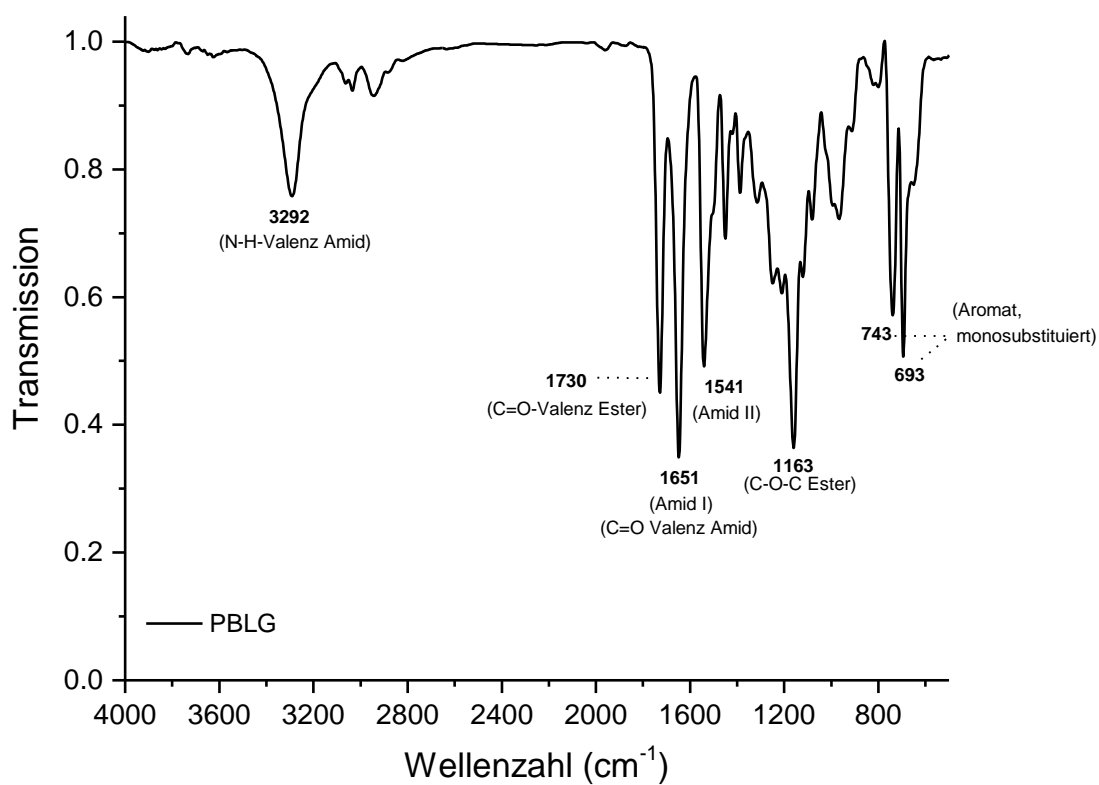
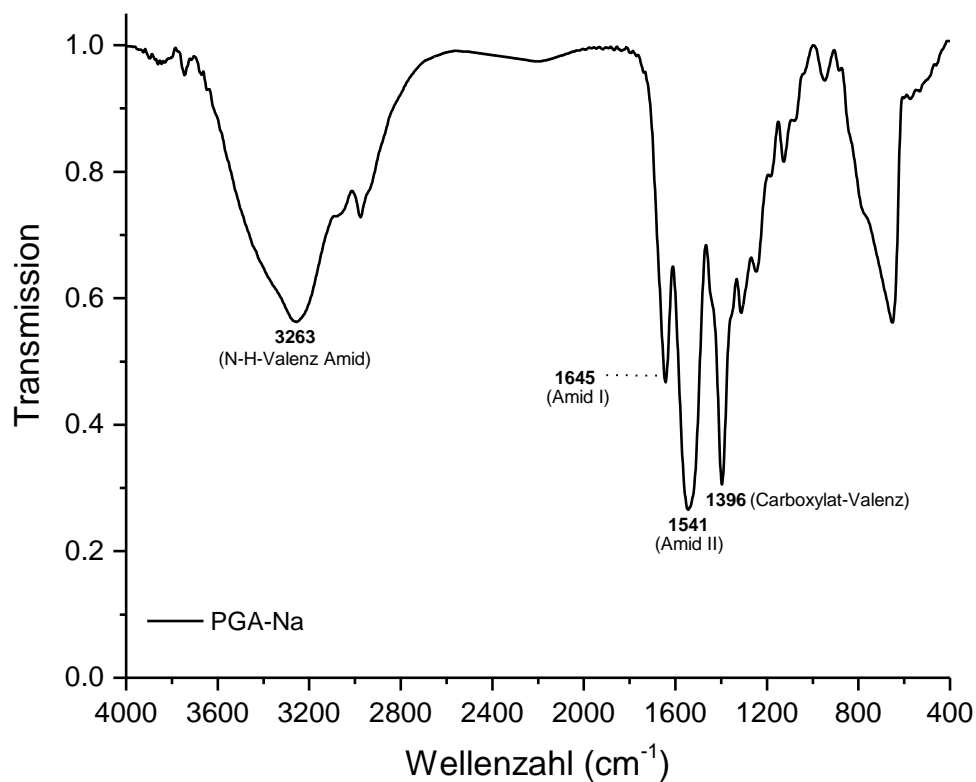
Anhang 16  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von  $\epsilon$ -Z-Lysin-NCA in  $\text{CDCl}_3$  (+TMS) (400 MHz, RT)

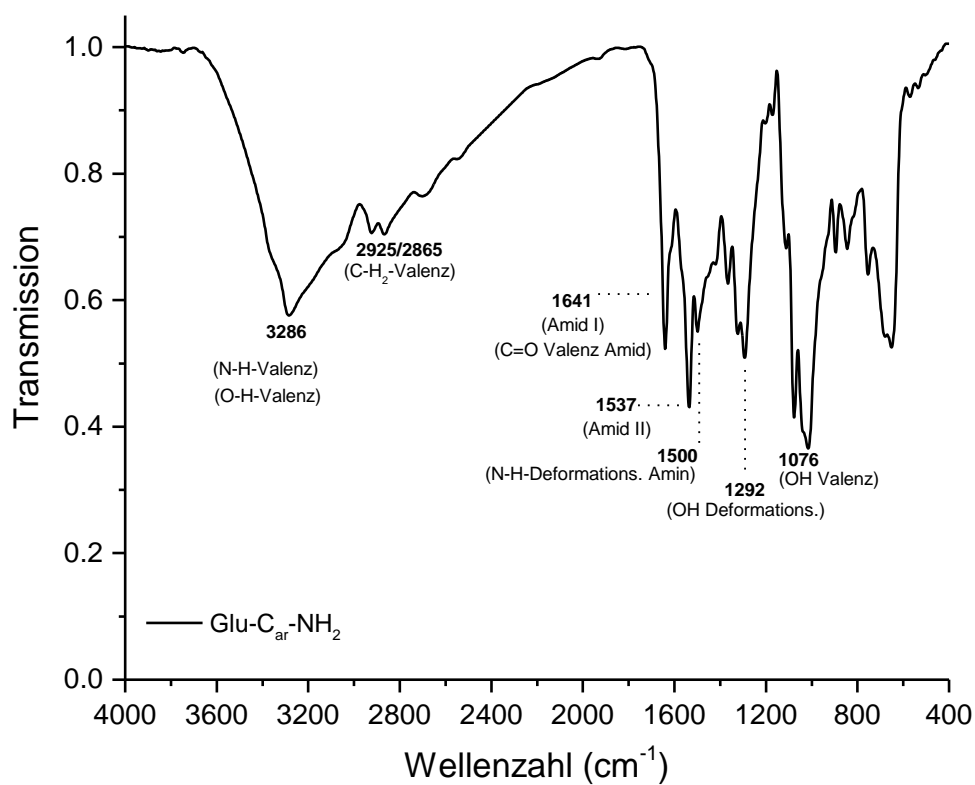
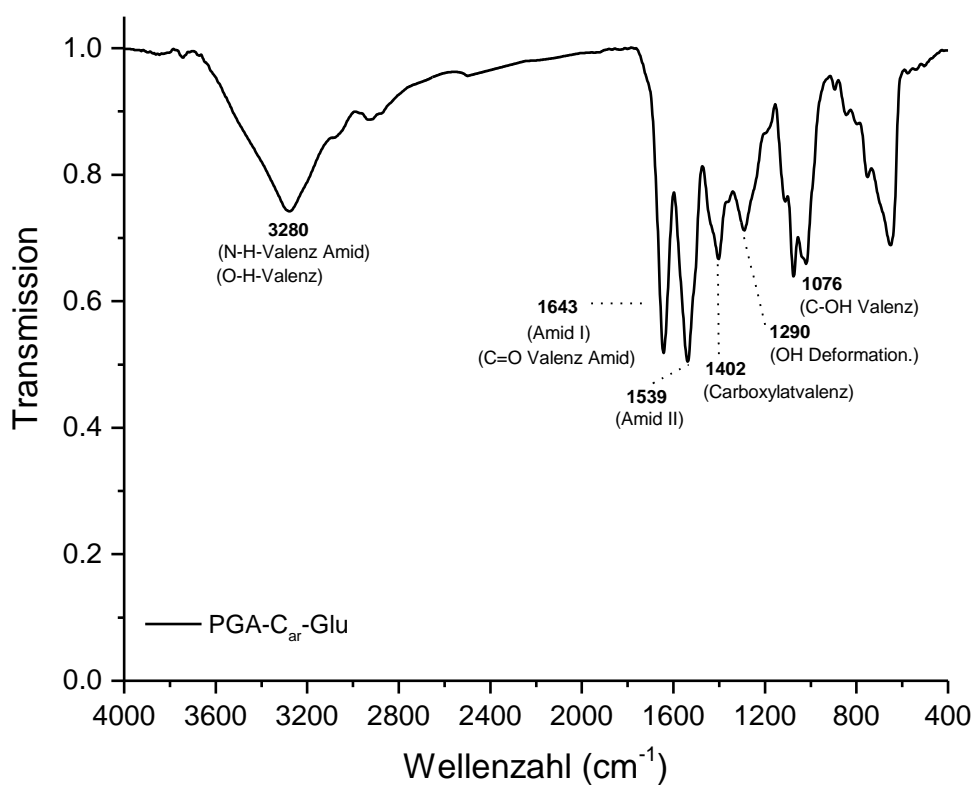


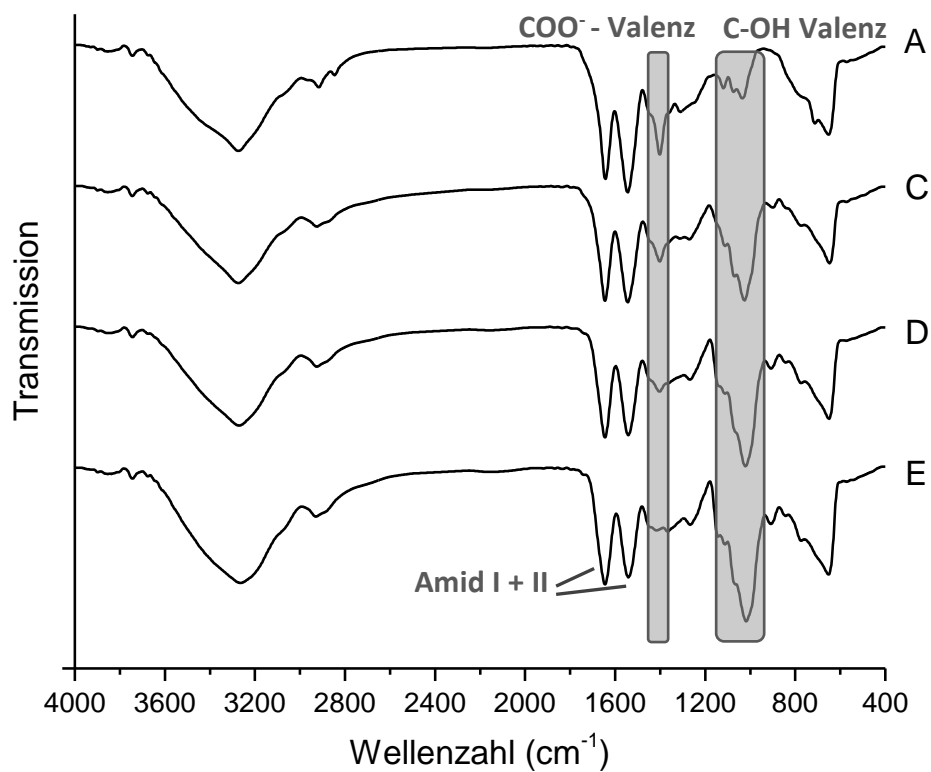
Anhang 17 <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von PZLL-*b*-pNIPAM in CDCl<sub>3</sub> + TFA (3:1) (400 MHz, RT)Anhang 18 <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von PLL-*b*-pNIPAM in D<sub>2</sub>O (+DSS) (400 MHz, RT)



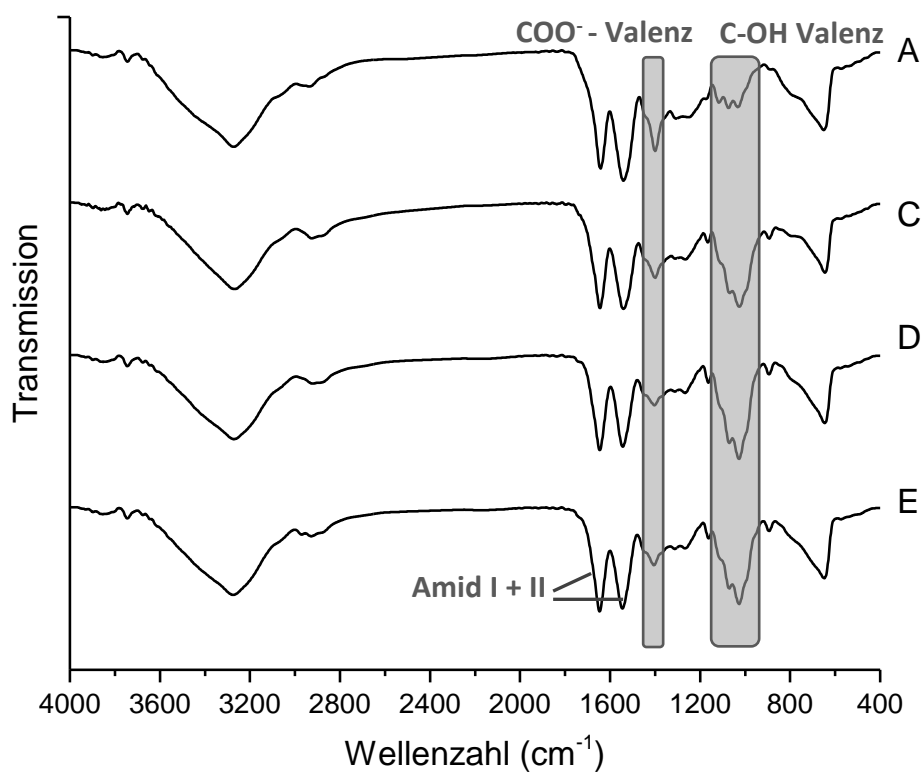
**Anhang 19  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von PGA-Lactose (DP 54) in  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz, RT), nachdem das Glycopolypeptid 5h bei pH 2.5 gelagert wurde (oben) und bevor es mit HCl-Lösung behandelt wurde (unten)**

**FTIR-Spektren****Anhang 20 ATR-FTIR-Spektrum von PBLG****Anhang 21 ATR-FTIR-Spektrum von PGA-Na**

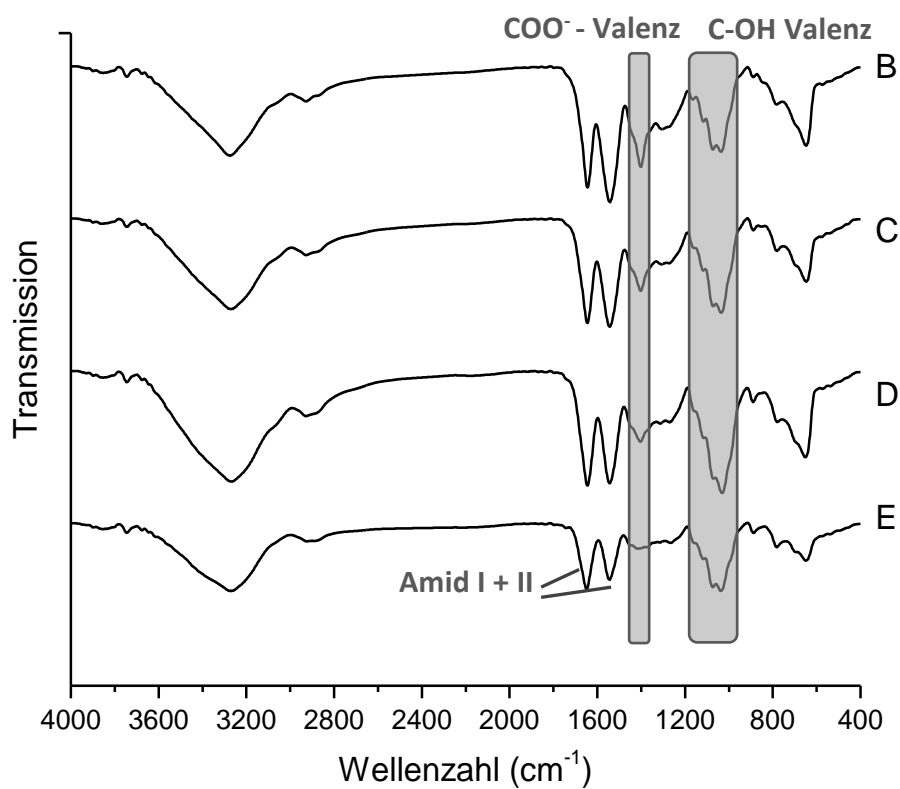
Anhang 22 ATR-FTIR-Spektrum von Glucose-C<sub>ar</sub>-NH<sub>2</sub>Anhang 23 ATR-FTIR-Spektrum von PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose (DP 56, DS 0.41)



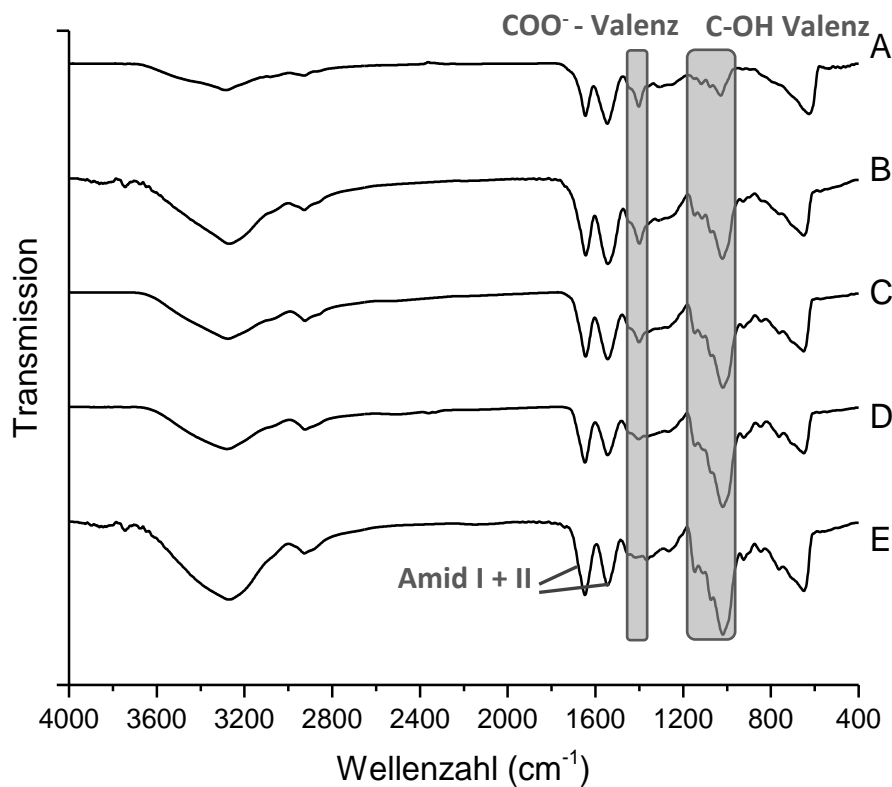
Anhang 24 ATR-FTIR-Spektren von PGA-Maltobiose mit DS 8 % (A), DS 40 % (C) DS 64 % (D) und DS 80 % (E)



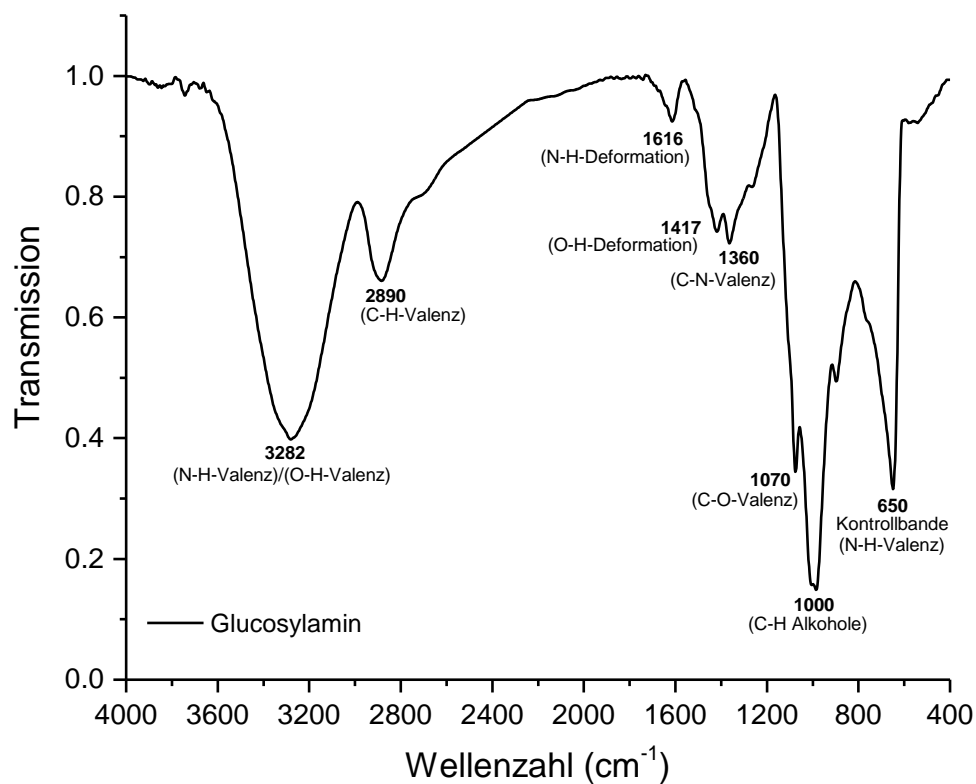
Anhang 25 ATR-FTIR-Spektren von PGA-Cellobiose mit DS 7 % (A), DS 36 % (C) DS 55 % (D) und DS 74 % (E)



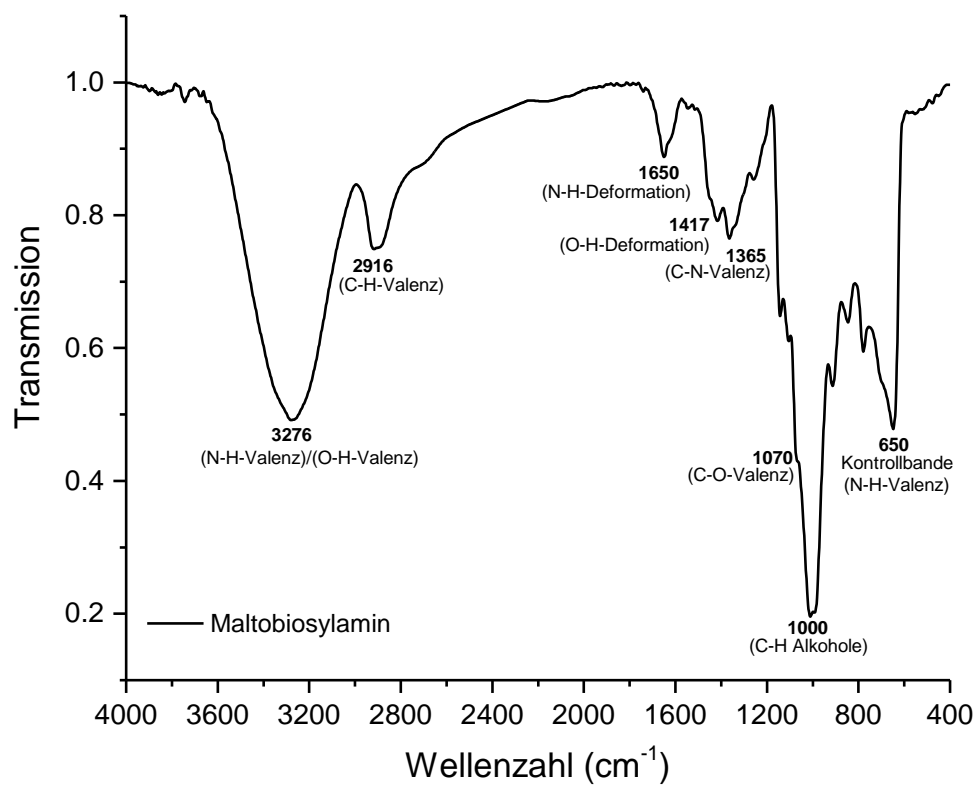
Anhang 26 ATR-FTIR-Spektren von PGA-Lactose mit DS 19 % (B), DS 36 % (C) DS 54 % (D) und DS 80 % (E)



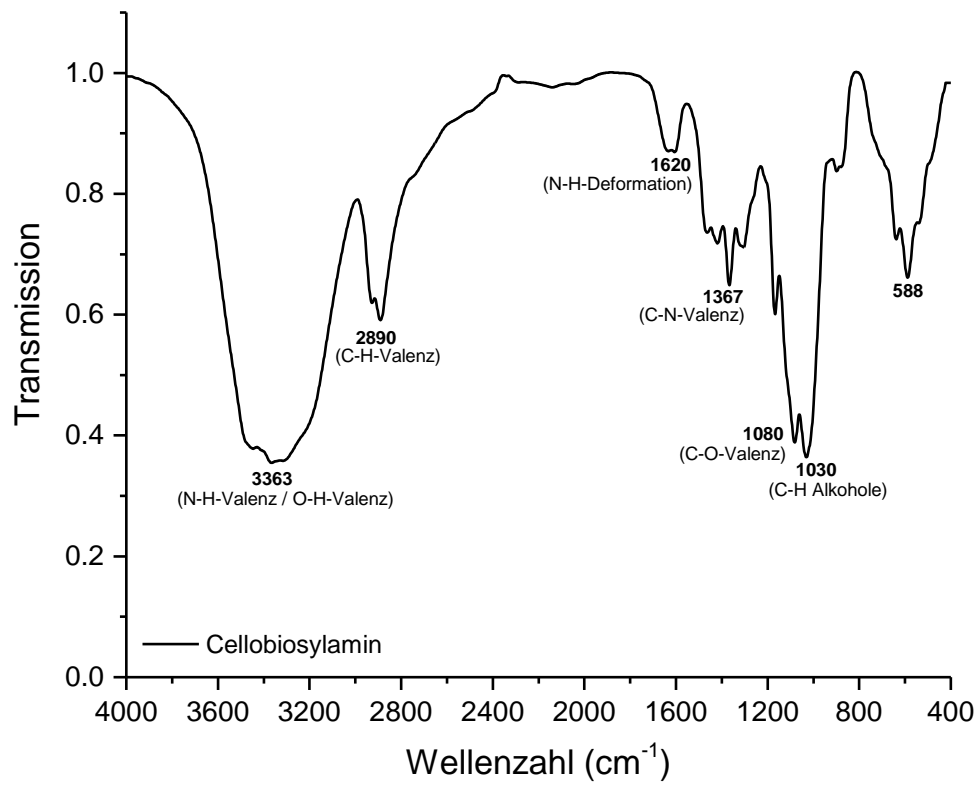
Anhang 27 ATR-FTIR-Spektren von PGA-Maltotriose mit DS 7% (A), DS 20 % (B), DS 39 % (C) DS 61 % (D) und DS 80 % (E)



Anhang 28 ATR-FTIR Spektrum von Glucosylamin



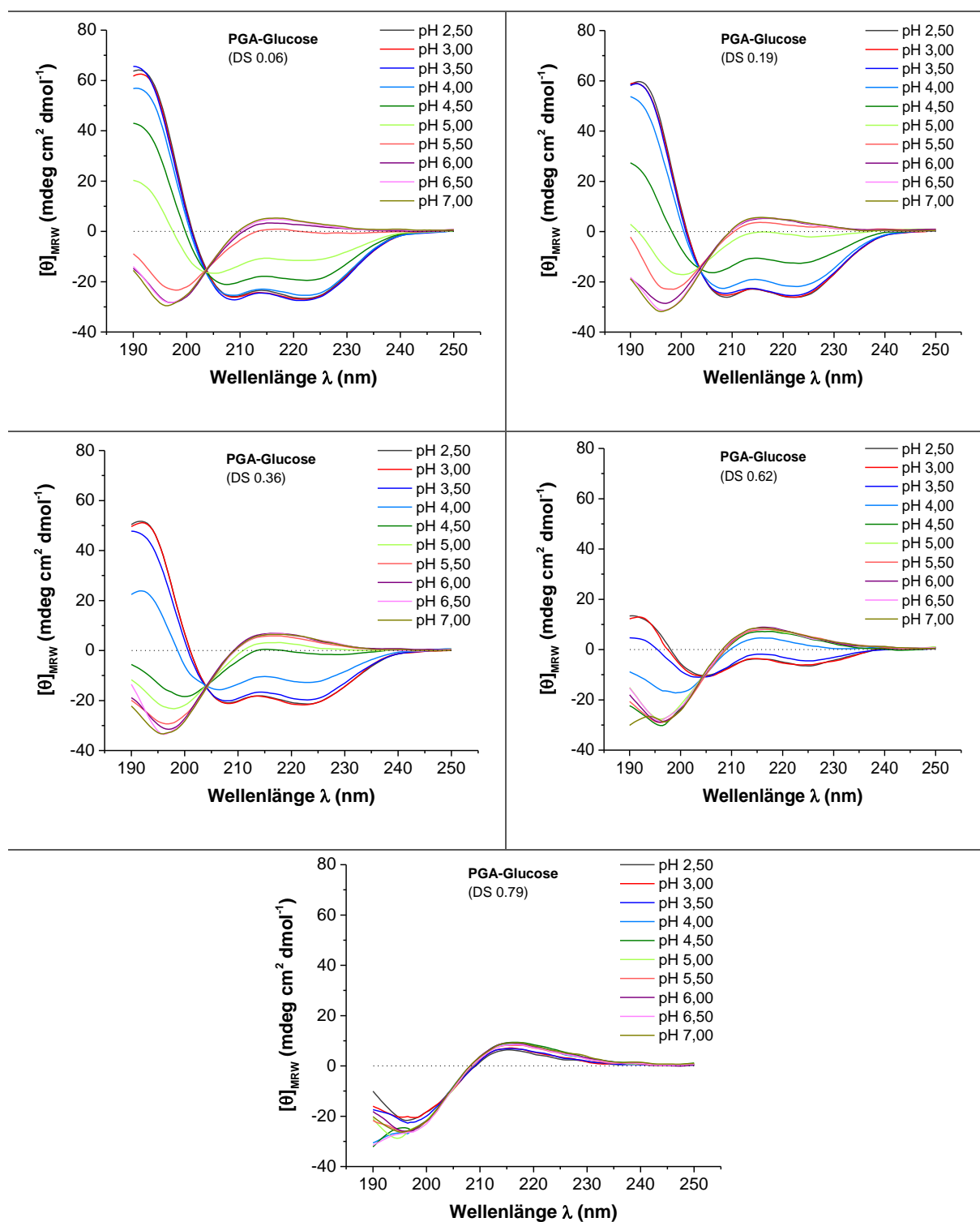
Anhang 29 ATR-FTIR Spektrum von Maltobiosylamin



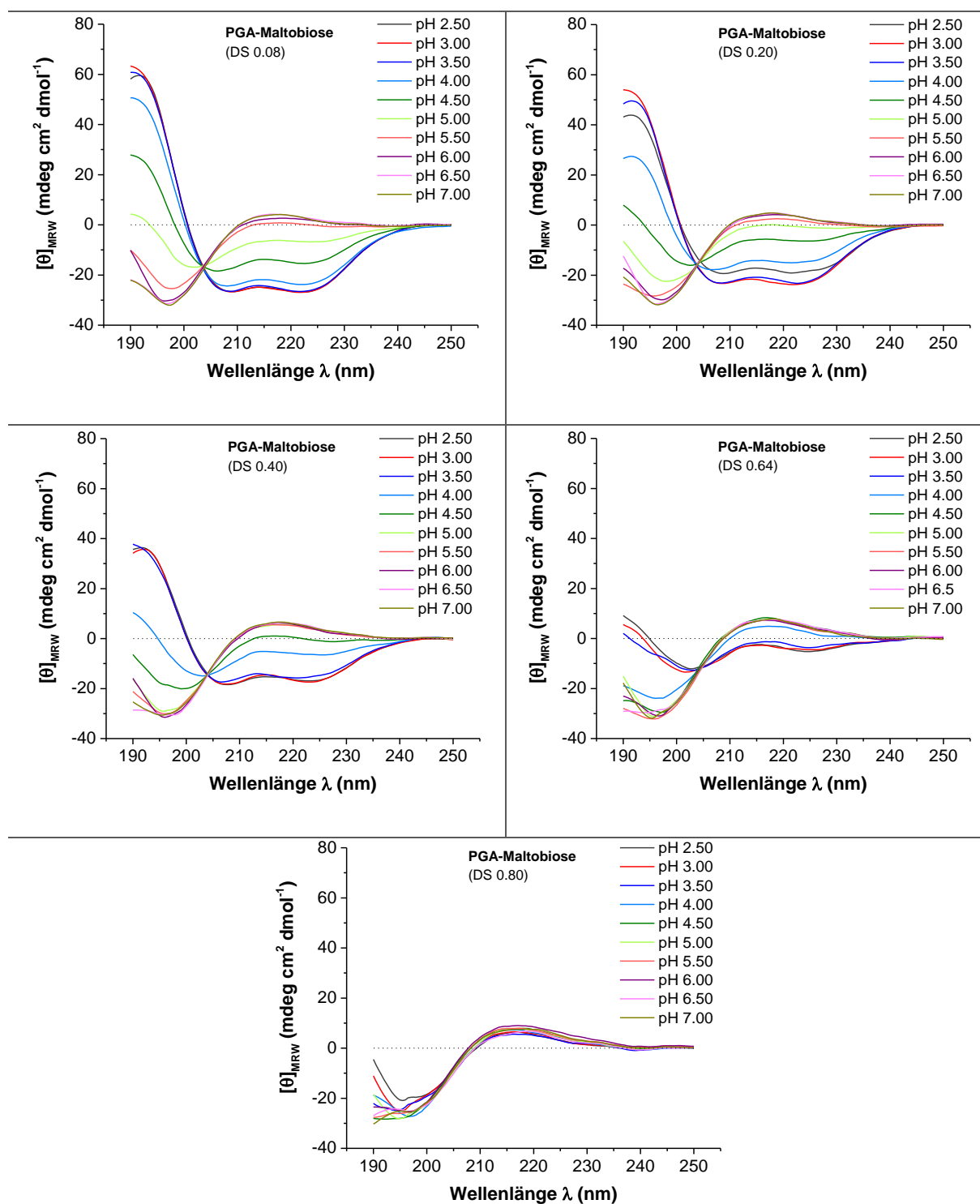
Anhang 30 FTIR-Spektrum (KBr) von Cellobiosylamin



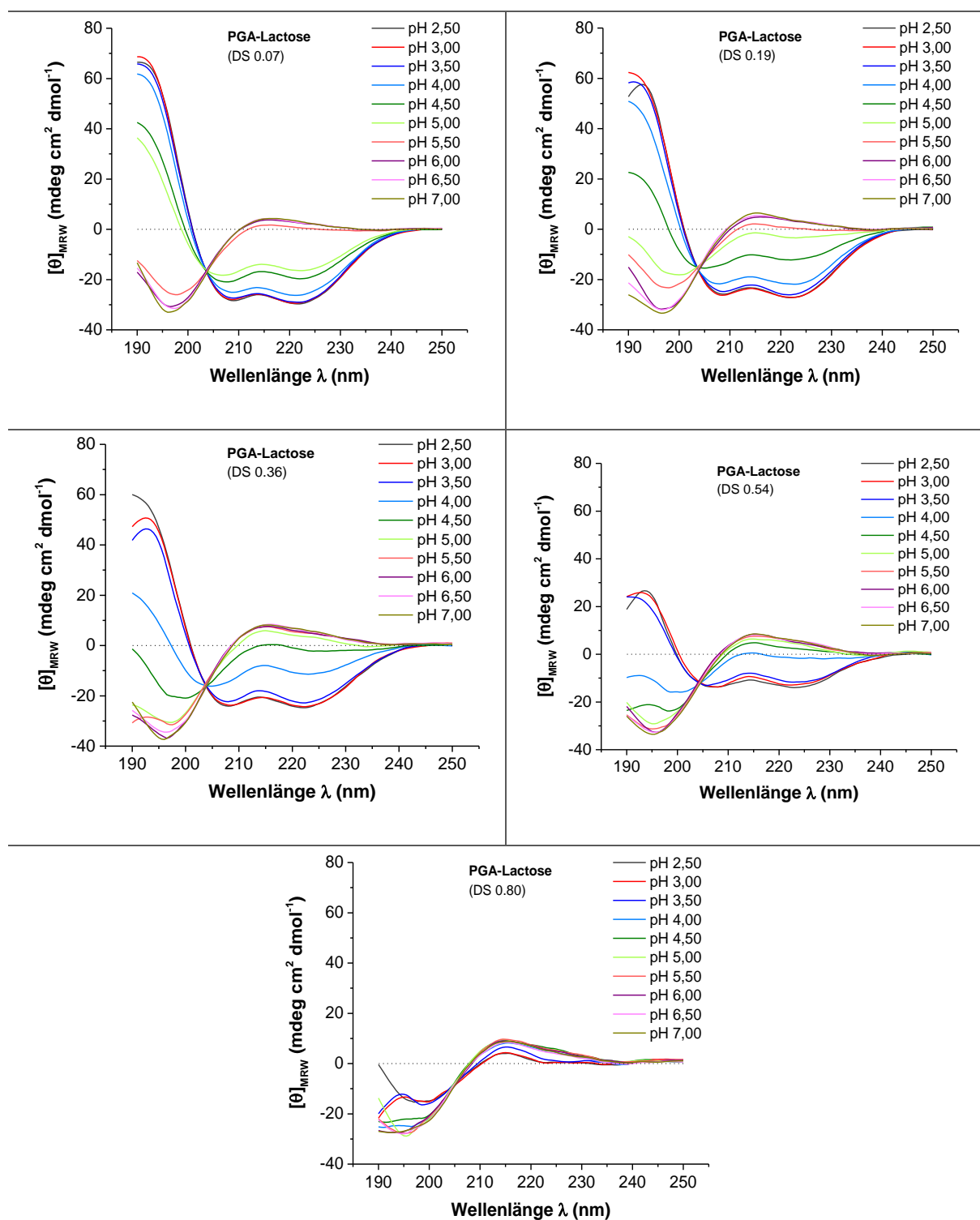
## CD-Spektren



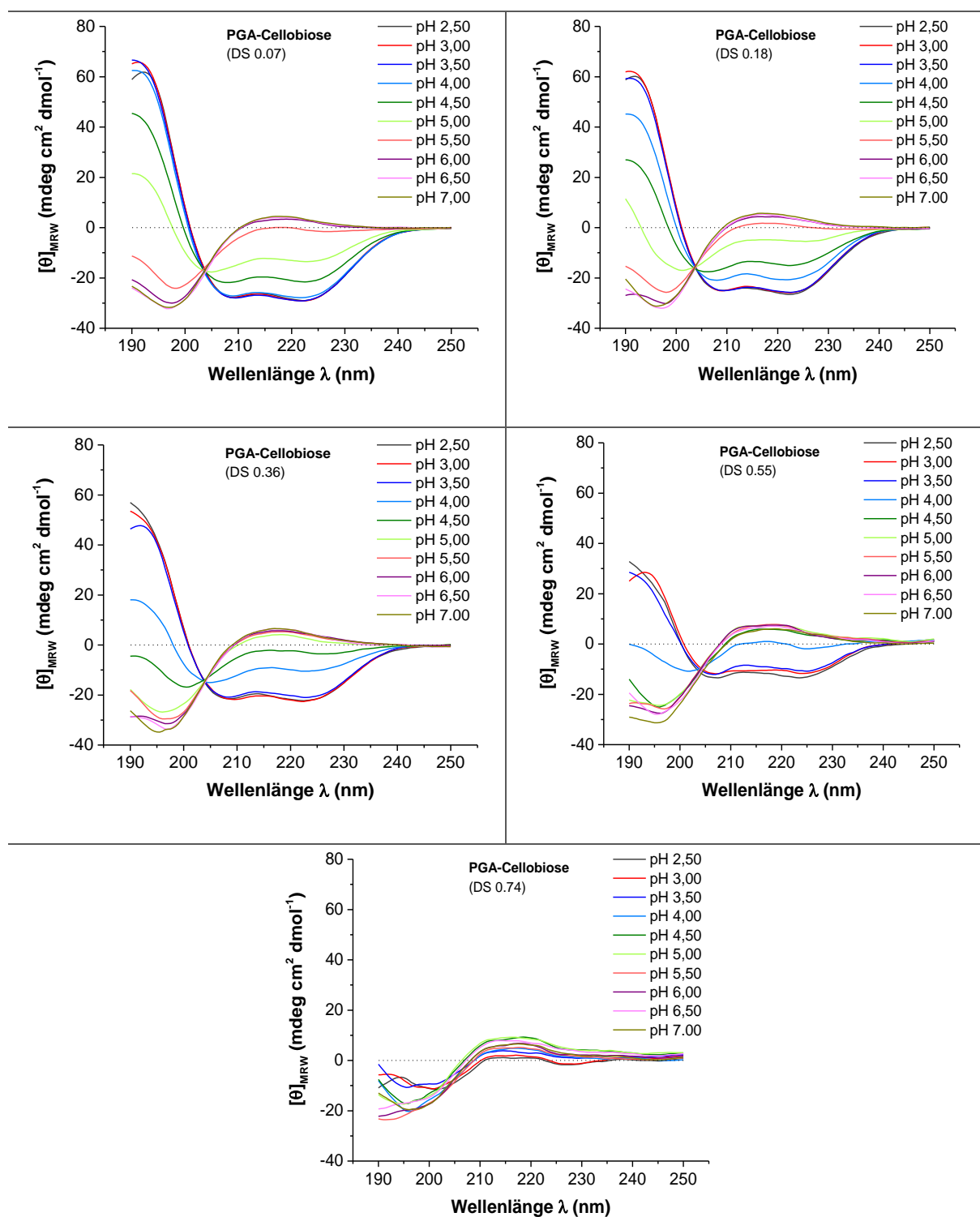
Anhang 31 CD-Spektren von PGA-Glucose (DP 62) mit unterschiedlichen Substitutionsgraden bei verschiedenen pH-Werten



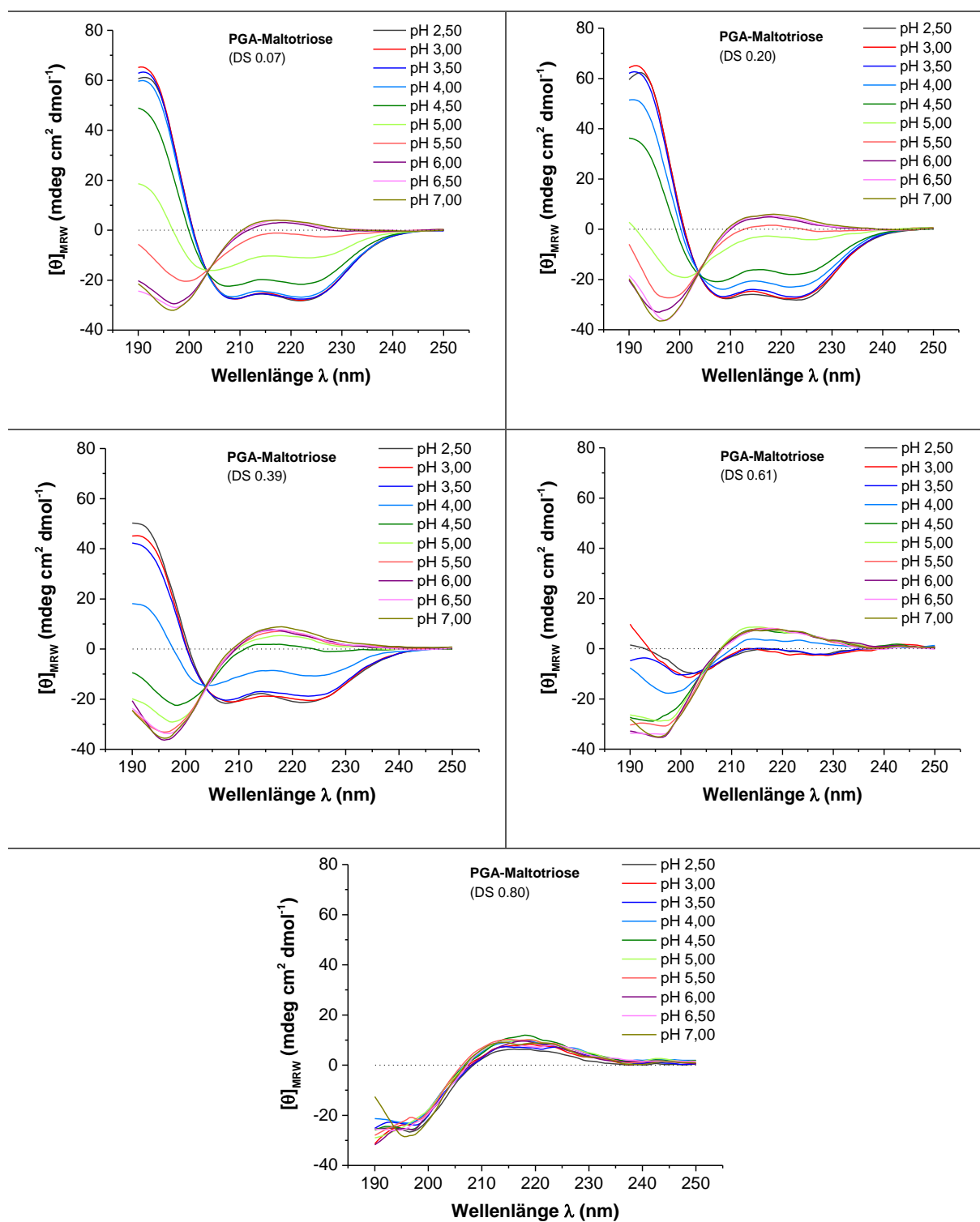
Anhang 32 CD-Spektren von PGA-Maltobiose (DP 56) mit unterschiedlichen Substitutionsgraden bei verschiedenen pH-Werten



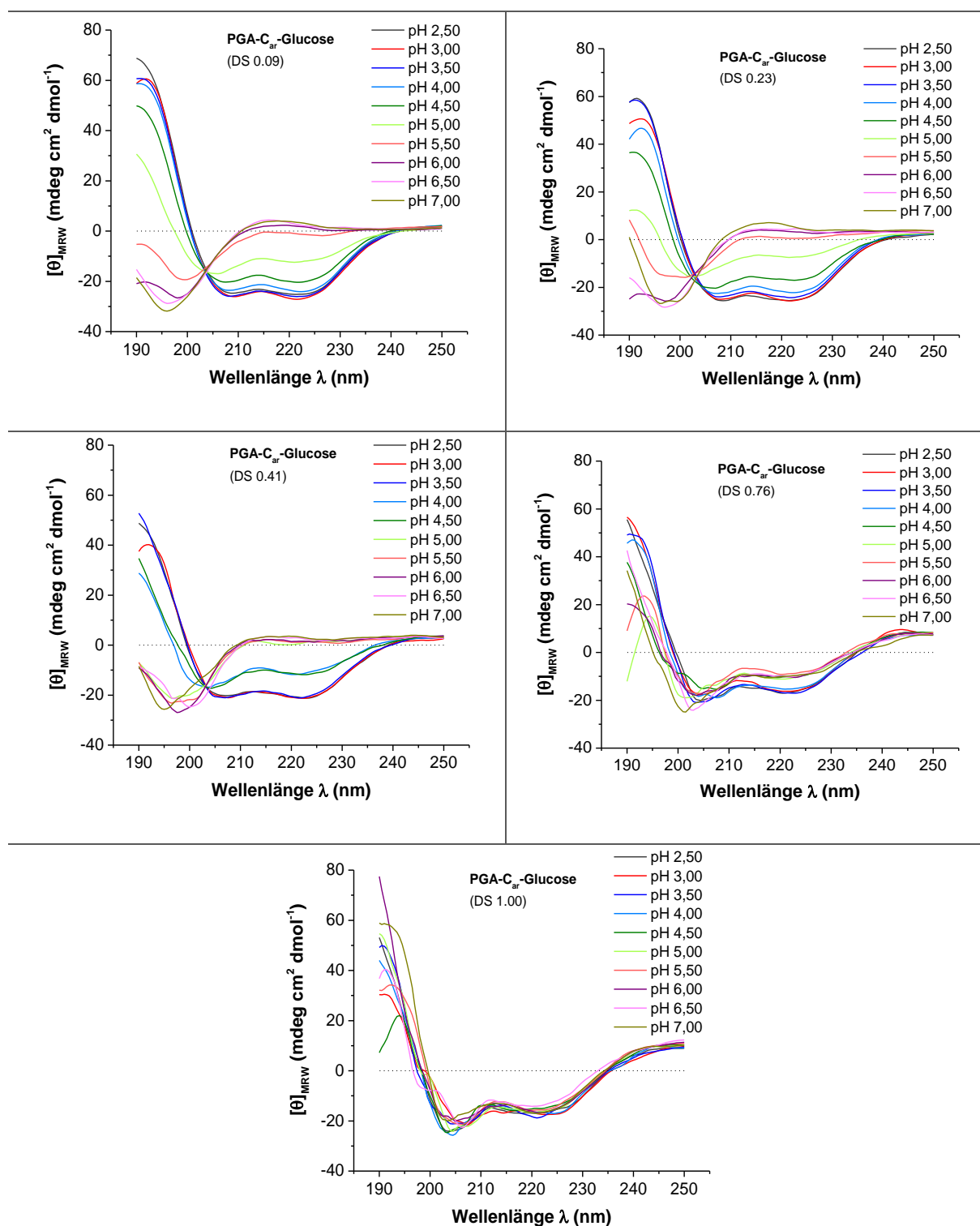
Anhang 33 CD-Spektren von PGA-Lactose (DP 54) mit unterschiedlichen Substitutionsgraden bei verschiedenen pH-Werten



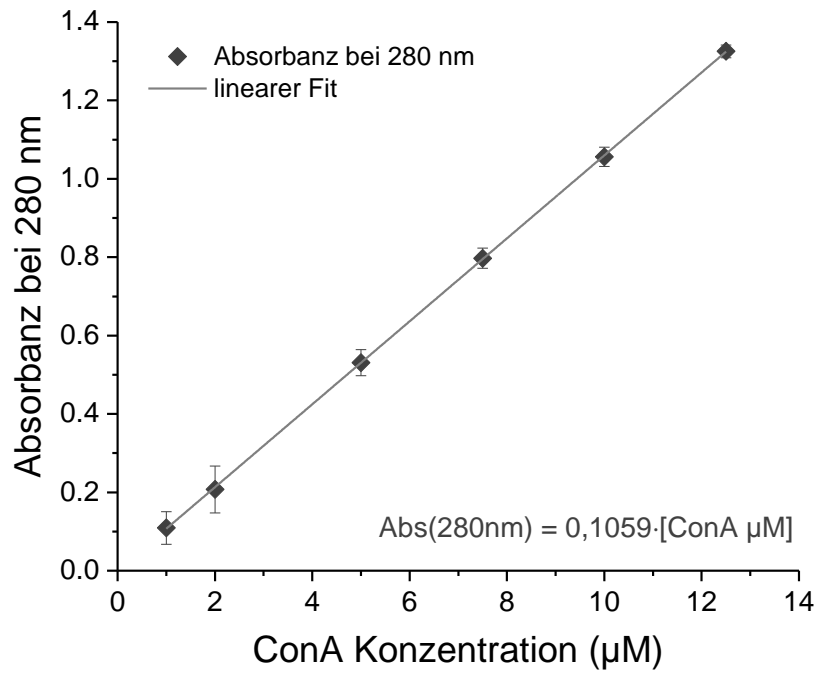
Anhang 34 CD-Spektren von PGA-Cellobiose (DP 60) mit unterschiedlichen Substitutionsgraden bei verschiedenen pH-Werten



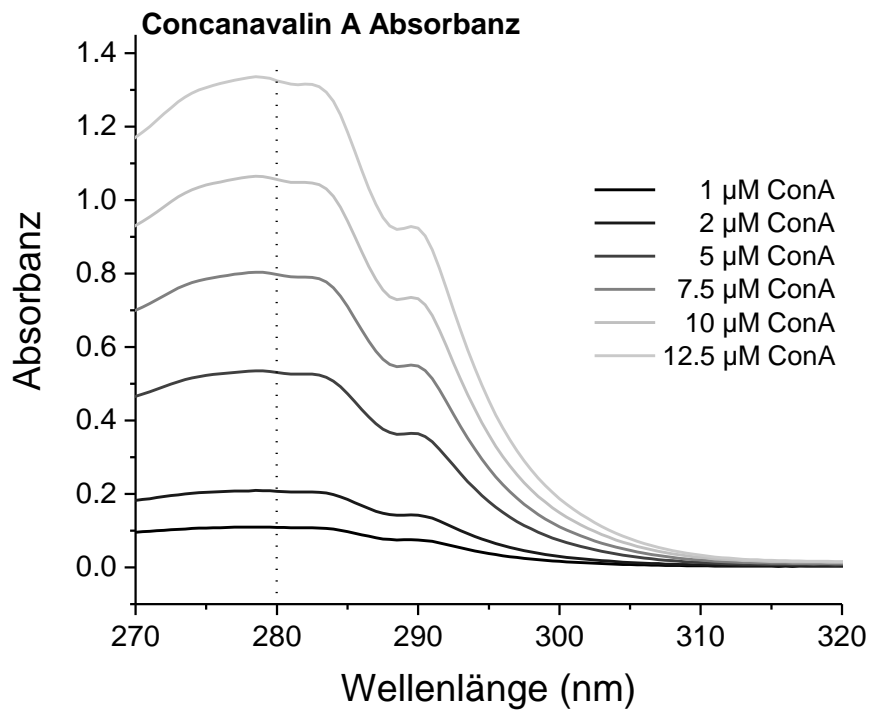
Anhang 35 CD-Spektren von PGA-Maltotriose (DP 54) mit unterschiedlichen Substitutionsgraden bei verschiedenen pH-Werten



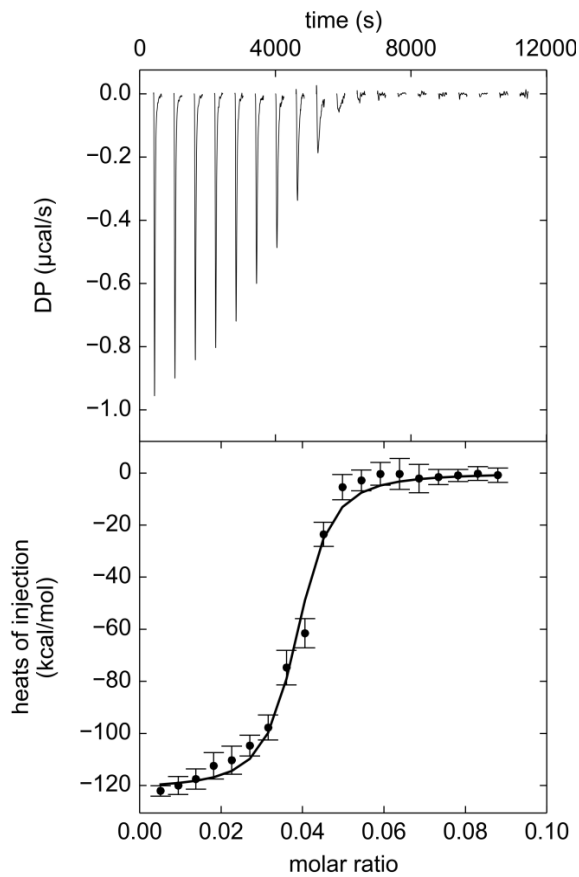
Anhang 36 CD-Spektren von PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose (DP 56) mit unterschiedlichen Substitutionsgraden bei verschiedenen pH-Werten

Quantitative Präzipitation

Anhang 37 UV/Vis Kalibrierung mit Concanavalin A



Anhang 38 UV/Vis-Spektren der Concanavalin A Absorbanz in HBS-Puffer pH 7.4 über einen Wellenlängenbereich von 270-320 nm

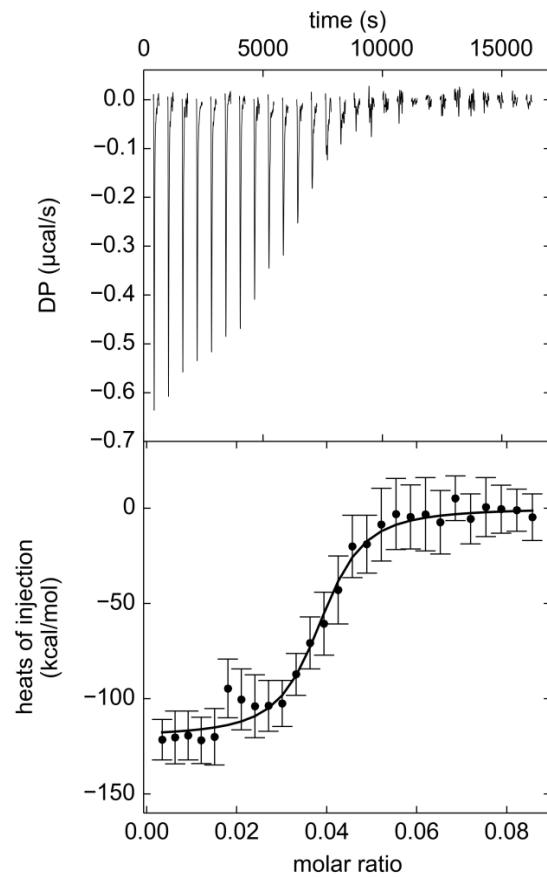
ITC Thermogramme

$$K_d = 22.9 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -121.37 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -10.41 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.37 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$



$$K_d = 31 \text{ nM}$$

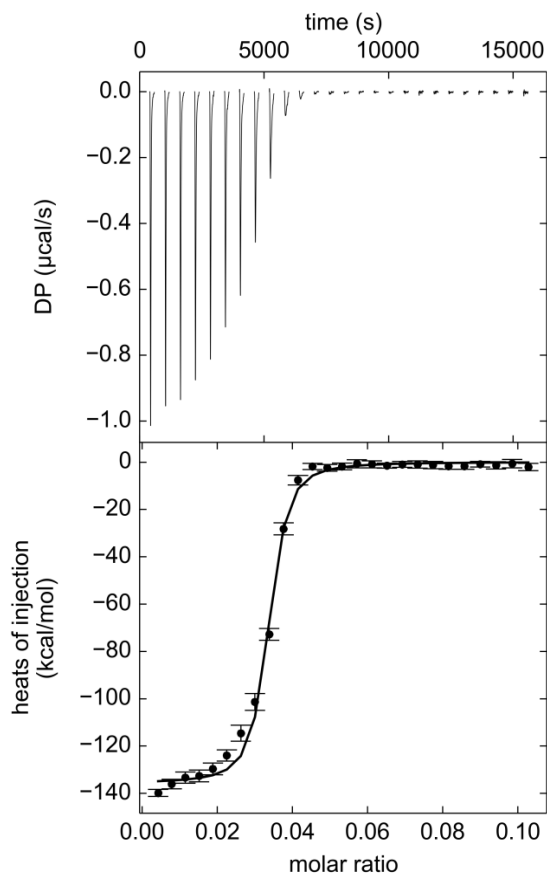
$$\Delta H = -119.82 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -10.23 \text{ kcal/mol}$$

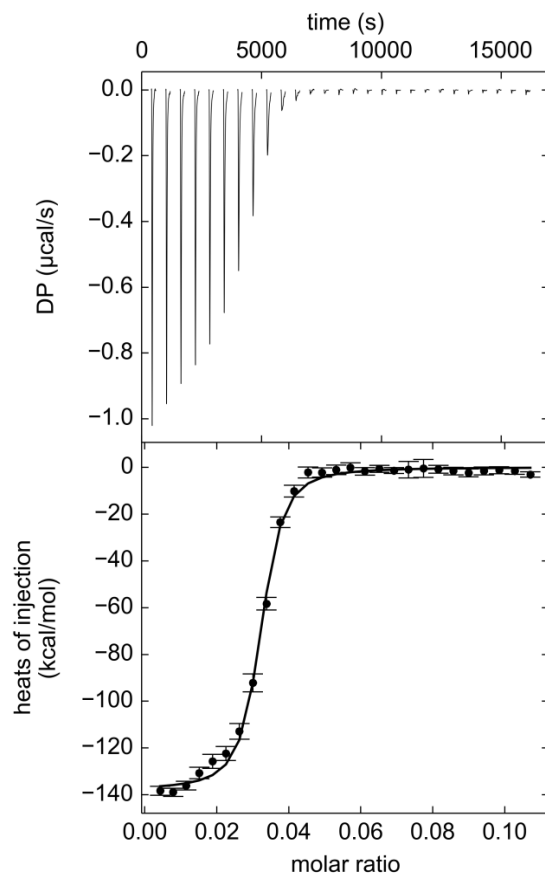
$$\Delta S = -0.37 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$

**Anhang 39 ITC Thermogramme von PGA-Maltobiose (DP 100, DS 0.63)**  
**ConA 50  $\mu\text{M}$  in Messzelle und PGA-Maltobiose 30  $\mu\text{M}$  (links) bzw. 20  $\mu\text{M}$  (rechts) in Spritze**



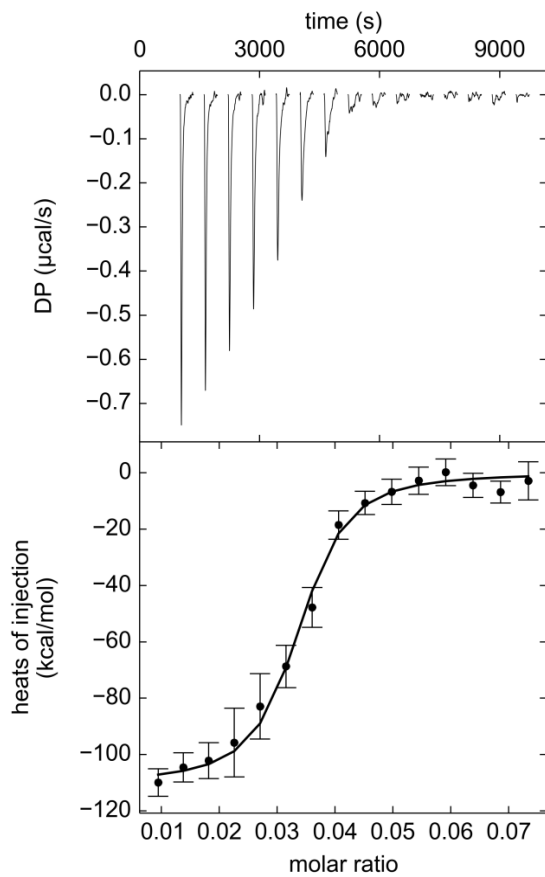


$K_d = 9.06 \text{ nM}$   
 $\Delta H = -135.77 \text{ kcal/mol}$   
 $\Delta G = -10.96 \text{ kcal/mol}$   
 $\Delta S = -0.42 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$



$K_d = 14.77 \text{ nM}$   
 $\Delta H = -137.92 \text{ kcal/mol}$   
 $\Delta G = -10.67 \text{ kcal/mol}$   
 $\Delta S = -0.43 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$

**Anhang 40 ITC Thermogramme von PGA-Maltobiose (DP 100, DS 0.81)**  
**ConA 50  $\mu\text{M}$  in Messzelle und PGA-Maltobiose 25  $\mu\text{M}$  in Spritze**

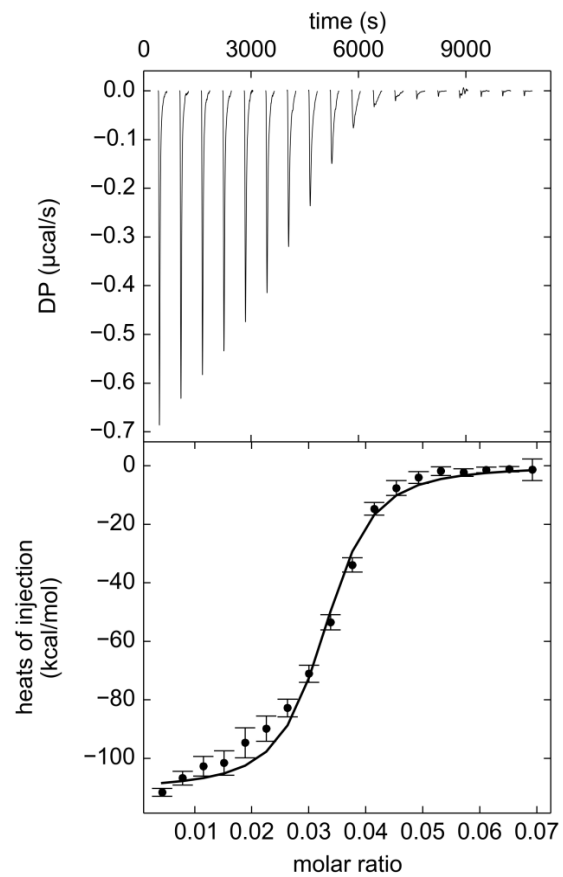


$$K_d = 27.1 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -110.20 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -10.17 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.36 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$



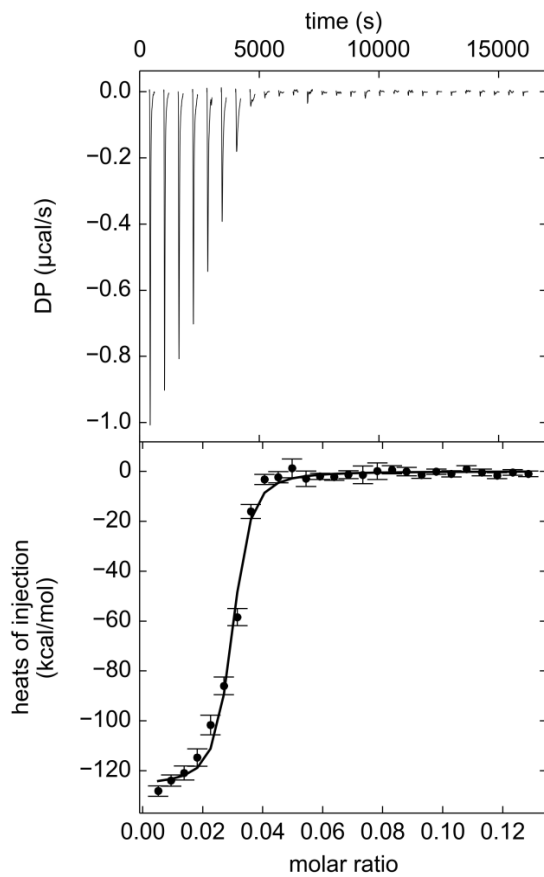
$$K_d = 27.9 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -110.74 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -10.29 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.34 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$

**Anhang 41 ITC Thermogramme von PGA-Maltotriose (DP 100, DS 0.60)**  
 ConA 50  $\mu\text{M}$  in Messzelle und PGA-Maltotriose 30  $\mu\text{M}$  (links) bzw. 25  $\mu\text{M}$  (rechts) in Spritze

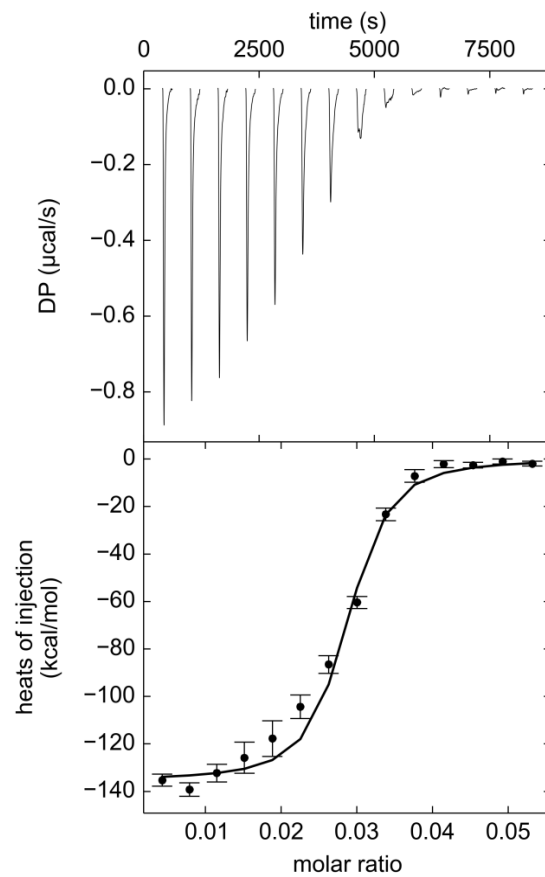


$$K_d = 15.5 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -125.35 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -10.64 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.39 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$



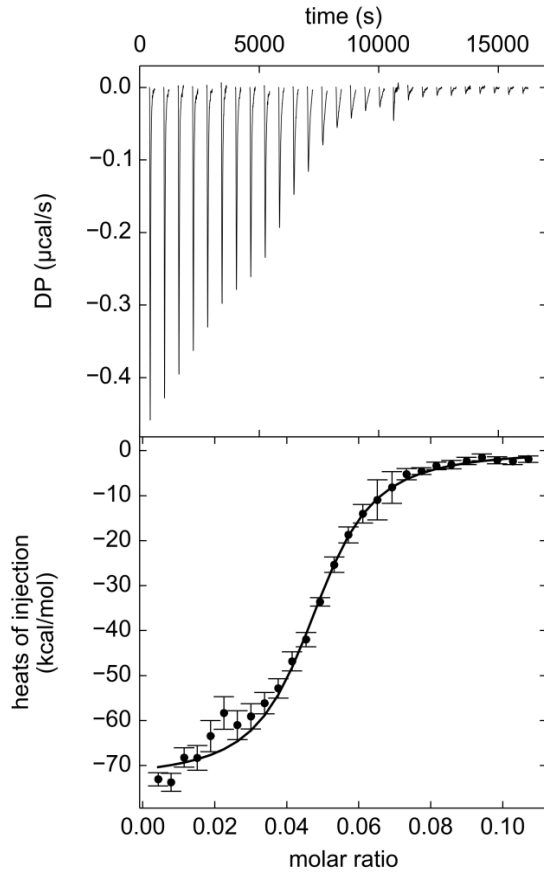
$$K_d = 13.7 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -135.48 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -10.72 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.42 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$

Anhang 42 ITC Thermogramme von PGA-Maltotriose (DP 100, DS 0.83)  
ConA 50  $\mu\text{M}$  in Messzelle und PGA-Maltotriose 30  $\mu\text{M}$  (links) bzw. 25  $\mu\text{M}$  (rechts) in Spritze

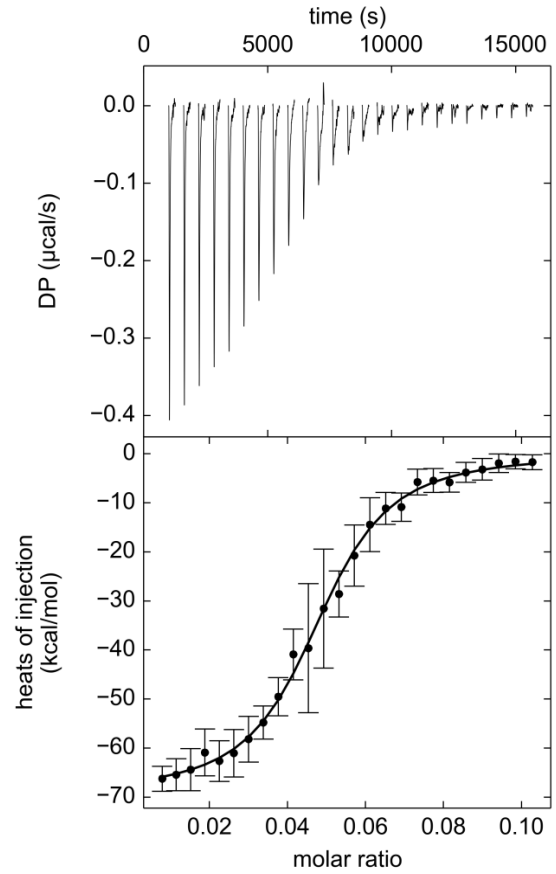


$$K_d = 74.5 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -72.82 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -9.71 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.21 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$



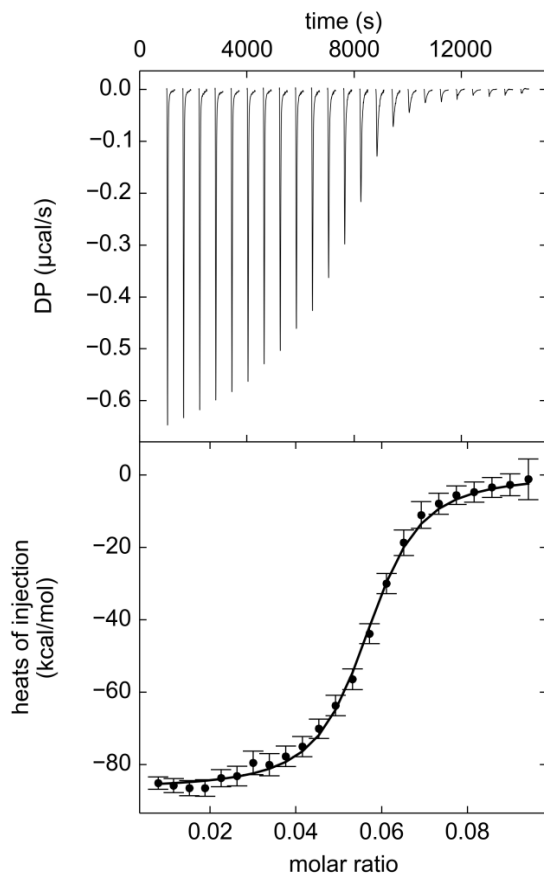
$$K_d = 91 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -69.1 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -9.59 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.20 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$

Anhang 43 ITC Thermogramme von PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose (DP 100, DS 0.49)  
ConA 50 µM in Messzelle und PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose 25 µM in Spritze

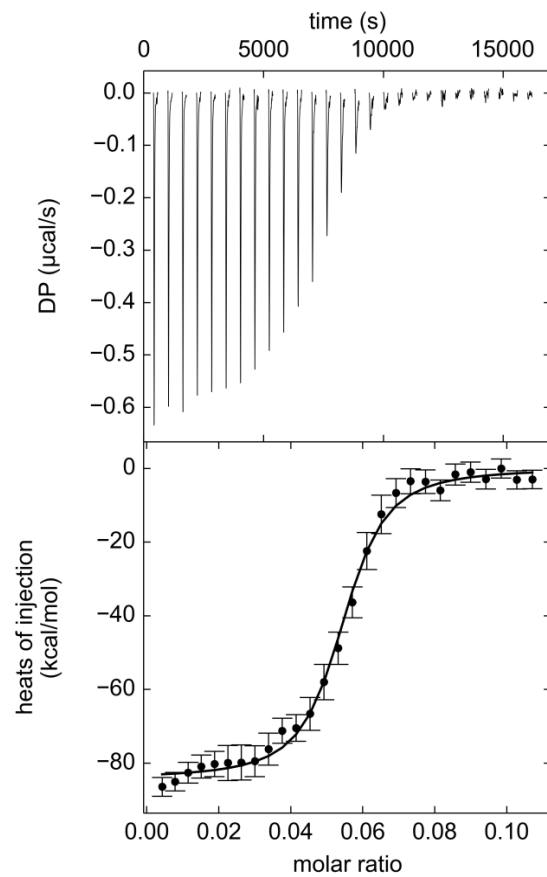


$$K_d = 34.3 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -86.73 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -10.17 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.26 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$



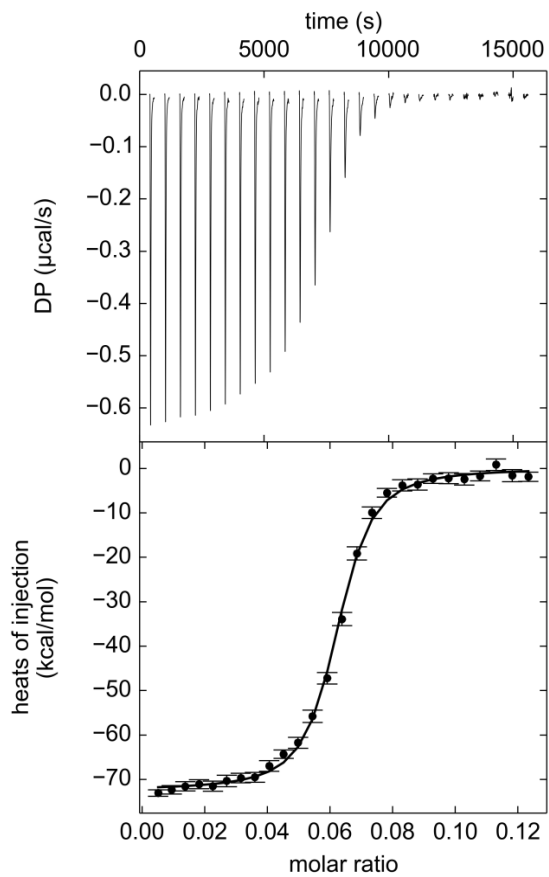
$$K_d = 33.9 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -84.18 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -10.17 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.25 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$

**Anhang 44 ITC Thermogramme von PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose (DP 100, DS 0.86)  
ConA 50 µM in Messzelle und PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose 25 µM in Spritze**

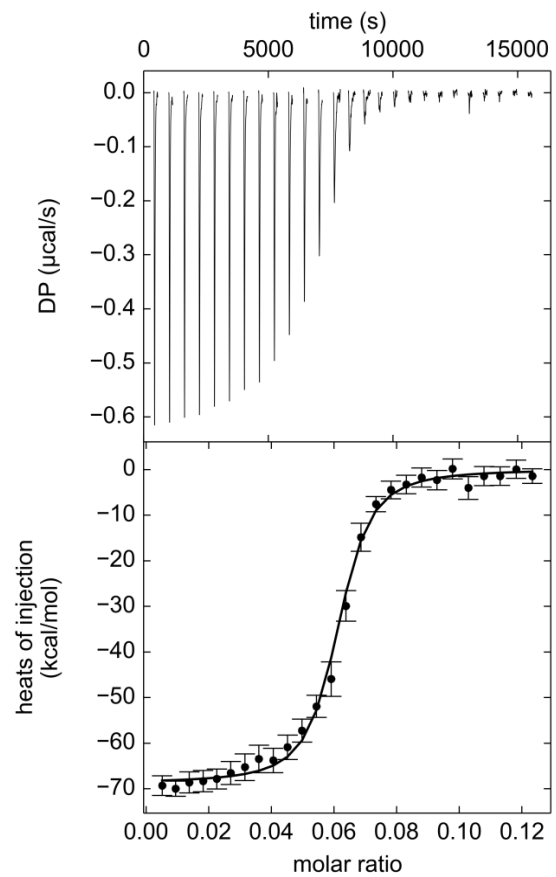


$$K_d = 25.6 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -72.44 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -10.35 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.21 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$



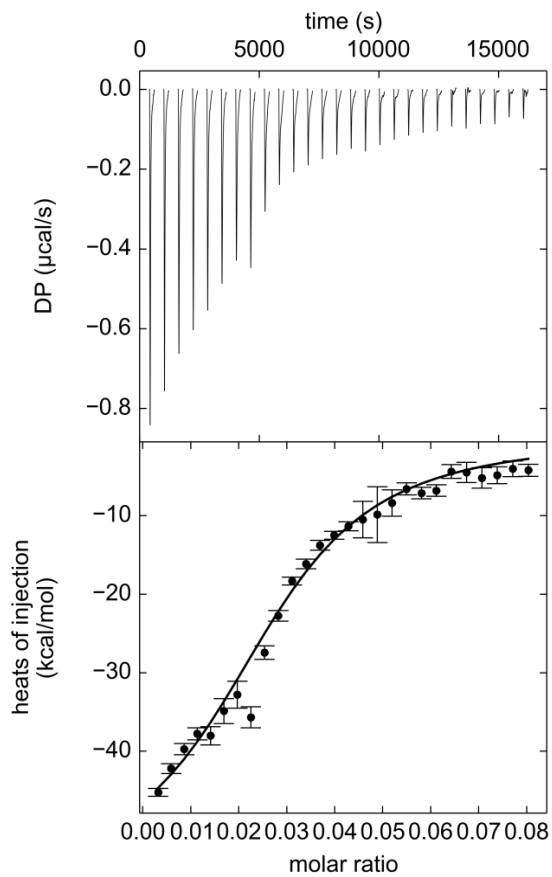
$$K_d = 22.4 \text{ nM}$$

$$\Delta H = -68.77 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -10.42 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.20 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$$

Anhang 45 ITC Thermogramme von PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose (DP 100, DS 1.00)  
ConA 50 µM in Messzelle und PGA-C<sub>ar</sub>-Glucose 30 µM in Spritze

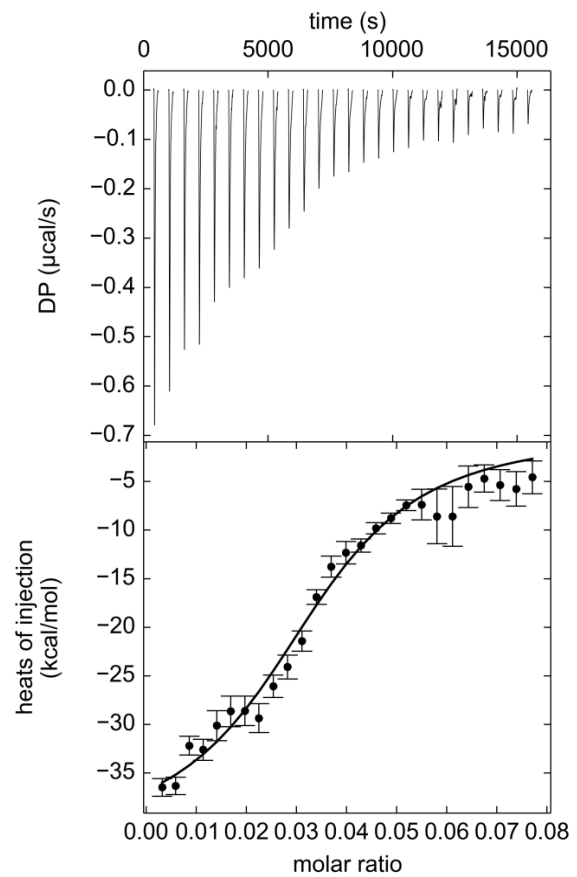


$$K_d = 1.32 \mu\text{M}$$

$$\Delta H = -56.41 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -8.01 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.16 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{K})$$



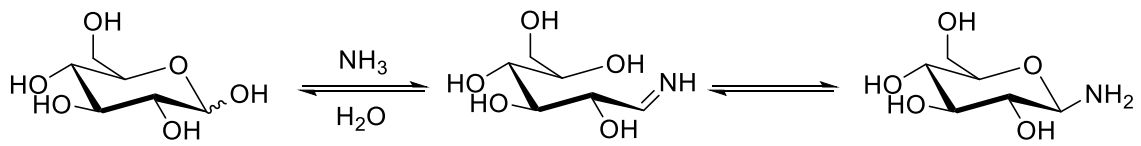
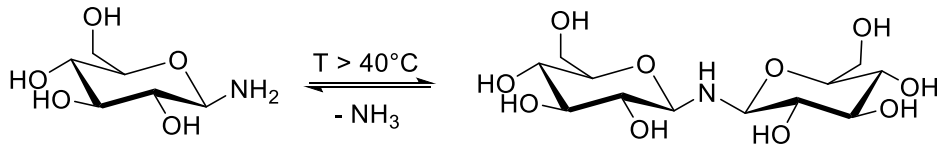
$$K_d = 0.96 \mu\text{M}$$

$$\Delta H = -41.62 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G = -8.20 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = -0.11 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{K})$$

Anhang 46 ITC Thermogramme von PGA-Glucose (DP 100, DS 0.82)  
ConA 200  $\mu\text{M}$  in Messzelle und PGA-Glucose 75  $\mu\text{M}$  in Spritze

Mechanismen**Kochetkov-Aminierung:****Dimer-Bildung:****Anhang 47 Mechanismus der KOCHETKOV-Aminierung von Glucose und Bildung des Di-β-D-Glucosylamin**